ROUTINENACHWEIS VON FREMDEIWEISSEN IN ERHITZTEN FLEISCH-ERZEUGNISSEN MITTELS POLYACRYLAMID-GEL-(DISK-)ELEKTROPHORESE

Leonhard Hellmannsberger

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546803_0021

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter

Arbeit angefertigt in der Veterinäruntersuchungsstelle
der Bundeswehr VI.

Leiter: OFVet. Dr. P. Maurus

ROUTINENACHWEIS VON FREMDEIWEISSEN IN ERHITZTEN FLEISCH-ERZEUGNISSEN MITTELS POLYACRYLAMID-GEL-(DISK-) ELEKTROPHORESE

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Leonhard Hellmannsberger

aus
Irching/Inn

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter

Korreferent: Prof. Dr. E. Scharrer

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

IN DANKBARKEIT MEINEN ELTERN

		Seite
1.1	Einleitung	1
1.2	Literatur	2
1.2.1	Begriffsbestimmung	2
1.2.1.1	"Fremdeiweiß"	2
1.2.2	Fremdeiweiß	2
1.2.2.1	Lebensmittelrechtliche Vorschriften für den Zusatz bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen	2
1.2.2.2	Zur technologischen Bedeutung bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen	4
1.2.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften der Eiweiße	6
1.2.3.1	Milcheiweiß	9
1.2.3.2	Lactalbumin	10
1.2.3.3	Eiklarproteine	11
1.2.3.4	Sojaeiweiß	12
1.2.3.5	Weizeneiweiß	12
1.2.4	Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen	13
1.2.4.1	Serologische Methoden	13
1.2.4.1.1	Präzipitation	14
1.2.4.1.1.1	Röhrchenpräzipitation	14
1.2.4.1.1.2	Agar-Gel-Diffussion	14
1.2.4.1.2	Immunelektrophorese	15
1.2.4.1.3	Fluoreszenzmarkierung	16
1.2.4.1.4	Hämagglutination	16
1.2.4.2	Nichtserologische Methoden	17
1.2.5	Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen	18

		Seite
1.2.6	Elektrophorese	19
1.2.6.1	Allgemein	19
1.2.6.2	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	20
1.2.6.3	Kontinuierliche und diskontinuierliche (DISK-) Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	21
1.2.6.3.1	Konzentrations- und Molekularsiebeffekt	21
1.2.6.4	Physikalisch-chemische Vorgänge	23
1.2.6.5	Tierartspezifische Eiweißdifferenzierung mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	24
1.2.6.6	Der Nachweis von Fremdeiweissen in Fleisch-Erzeugnissen mit der Polyacrylamid-Gel-Elekrophorese	26
2.	Eigene Untersuchungen	29
2.1	Geräte und Chemikalien für die Polyacrylamidgel-(Disk-) Elektrophorese	29
2.1.1	Geräte	29
2.1.2	Chemikalien	29
2.2	Arbeitsvorgang	30
2.2.1	Herstellung der Reagenzien	30
2.2.2	Vorbereitung der Trenneinheit	33
2.2.3	Gießen des Gels	33
2.2.4	Auftragen der Proben	34
2.2.5	Zusammensetzen der Trennkammer	34
2.2.6	Auftrennung und Entnahme des Gels	35
2.2.7	Fixierung der Proteinbanden	35
2.2.8	Färbung des Gels	35
2.2.9	Entfärbung des Gels	35
2.2.10	Densitometrische Auswertung	36

		Seite
2.3	Vorversuche	36
2.3.1	Gelsystem	36
2.3.2	Stromstärke und Spannung	37
2.3.3	Ermittlung der aufzutragenden Probenmengen	37
2.4	Hauptversuche	38
2.4.1	Verwendete Reinsubstanzen	38
2.4.2	Zusammensetzung der Modellwürste	38
2.4.3	Extraktion von Fremdeiweiß aus den Modellwürsten	39
2.5	Ergebnisse	40
3.1	Diskussion	60
4.1	Zusammenfassung - Summary	69
5.1	Literaturverzeichnis	73

1.1. Einleitung

Nach den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches gilt für Fleisch-Erzeugnisse das "bindegewebseiweißfreie Fleischeiweiß" (BEFFE) als wertbestimmender Faktor. In den Leitsätzen sind entsprechende Mindeswerte festgelegt.

Da noch keine befriedigende Verfahren zur direkten Bestimmung des BEFFE vorliegen, sollten wenigstens Fremdeiweiße und fremde Nicht-Eiweiß-Stickstoffsubstanzen sicher erfaßt werden.

Die bisher angewendeten serologischen Nachweismethoden sind meist aufwendig und deshalb für Massenuntersuchungen wenig geeignet. Bereits die Antigenherstellung ist arbeitsintensiv und zeitaufwendig und verursacht insbesondere im Routinebetrieb wegen der erforderlichen großen Zahl an Serumspendern (z.B. Kaninchen, Ratten) hohe Kosten.

Als ein Verfahren, das relativ geringen Arbeits- und Kostenaufwand erfordert und größere Untersuchungszahlen ermöglicht, bietet sich bei Fleisch-Erzeugnissen die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zur Eiweißdifferenzierung an. Meine Aufgabe war es, die Konzentration des Polyacrylamidgels zu finden, mit der man spezielle Fremdeiweiße (aufgeschlossenes Milcheiweiß, Eiklar, Lactalbumin, Sojaeiweiß und Weizeneiweiß) gesichert nachweisen kann.

1.2. Literatur

1.2.1 Begriffsbestimmung

1.2.1.1 "Fremdeiweiß"

In den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches für Fleisch und Fleisch-Erzeugnisse wird "Fremdeiweiß" als Eiweiß definiert, "das nicht von Schlachttierteilen stammt, z.B. Eiklar, Milcheiweiß, Sojaeiweiß, Weizeneiweiß". Diese Definition umfaßt alle pflanzlichen Eiweiße und alle Nichtfleischeiweiße tierischen Ursprungs.

1.2.2 Fremdeiweiß

1.2.2.1 Lebensmittelrechtliche Vorschriften für den Zusatz bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen.

Dem Einsatz bei der Fleischverarbeitung sind lebensmittelrechtlich enge Grenzen gesetzt. Nach § 17 (1), 2 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) ist es verboten (101):

"a) nachgemachte Lebensmittel,

b) Lebensmittel, die hinsichtlich ihrer Beschaffenheit von der Verkehrsauffassung abweichen und dadurch in ihrem Wert, insbesondere in ihrem Nähr- oder Genußwert oder in ihrer Brauchbarkeit nicht unerheblich gemindert sind oder

c) Lebensmittel, die geeignet sind, den Anschein eines besseren als der tatsächlichen Beschaffenheit zu erwecken,

ohne ausreichende Kenntlichmachung gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen."

Es ist davon auszugehen, daß der Verbraucher in Fleisch-Erzeugnissen als Eiweiß nur Fleischeiweiß erwartet und jeden Ersatz von Fleischeiweiß durch Fremdeiweiß als Wertminderung oder wenigstens als Täuschung ansieht, wenn dieses nicht ausdrücklich kenntlich gemacht ist.

Der VO-Geber hat deshalb in § 3 der Fleisch-VO sämtliche Fremdeiweiße zuerst einmal verboten, d.h. zulassungspflichtig gemacht und dann in den Anlagen 2 und 3 notwendige Ausnahmen ausgesprochen.

Nach Anlage 2 der Fleisch-Verordnung sind 2 % aufgeschlossenes Milcheiweiß bezogen auf die verwendete Fleisch- und Fettmenge ohne Deklaration für Brät zugelassen, das der Herstellung von Fleischsalatgrundlage dient. Außerdem sind Flüssigei, flüssiges Eigelb, gefrorenes Vollei und gefrorenes Eigelb bis zu 5 % für die Herstellung von Leberwurst, Leberpasteten, Leberparfaits und -cremes sowie Wild- und Geflügelpasteten und bis zu 3 % für die Herstellung von Pasteten und Rouladen nach Art der Brühwurst sowie grober Bratwurst und Rheinischer Bratwurst deklarationsfrei erlaubt. Analoge Freistellungen betreffen Zutaten wie Milch, Käse, Eier, Eiprodukte und Getreideerzeugnisse bei küchenfertig vorbereiteten und tafelfertig zubereiteten Fleisch-Erzeugnissen.

In Anlage 3 der Fleisch-VO ist festgelegt, unter welchen Bedingungen bei höher zu erhitzenden Brühwürsten und Kochstreichwürsten sowie tafelfertig zubereiteten Fleisch-Erzeugnissen unter Deklaration aufgeschlossenes Milcheiweiß verwendet werden darf. Einem Kenntlichmachungszwang sind in dieser Anlage u.a. auch die Verwendung von bestimmten Eiprodukten für Brühwürste, von Milch für Brat- und Brühwürste sowie Sahneerzeugnisse für Leberwurst unterworfen.

Zur Zeit wird allerdings diskutiert, ob nicht nach der Reform des Lebensmittelrechts, d.h. nach dem Ersatz des früheren § 4 des LMG durch § 17 LMBG nicht jeglicher Zusatz von Fremdeiweiß zu Fleisch-Erzeugnissen dann zulässig ist, wenn eine ausreichende Kenntlichmachung erfolgt, d.h. jegliche Verbrauchertäuschung ausgeschlossen ist. Doch diese Frage sei hier nicht weiter erörtert.

1.2.2.2 Zur technologischen Bedeutung bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen

Eiweißstoffe haben in zerkleinerten Fleisch-Erzeugnissen überwiegend die Funktion, Feuchtigkeit zu binden, um saftige Produkte zu garantieren und Fett zu emulgieren, um die Produkte im wesentlichen "geschmeidig" zu machen. Fremdeiweiße erhöhen in der Regel bereits in kleinen Mengen die Emulsions- und Wasserbindungsfähigkeit der Wurstmasse. Weil es bei der Erhitzung von Kochstreichwürsten im Zuge der Eiweißdenaturation zu einer Minderung der Wasserbindefähigkeit und der Emulgierkapazität kommt, und dies leicht zu Saft- bzw. Gelee- und Fettabsatz führt, sind manche Fremdeiweiße, die weniger hitzelabil sind, geeignet, den Fett- und Geleeabsatz zu mindern (7, 60).

Bei Brühwurst ist aber noch ein weiteres Phänomen beachtlich.

Nach KOTTER und PRÄNDL (58) muß bei der Brühwurstherstellung das teils suspendierte teils gelöste native Muskeleiweiß eine zusammenhängende Hitzekoagulation erfahren, damit ein schnittfestes Fertigfabrikat entsteht. Dazu müssen viele feinverteilte Muskeleiweißkörper vorliegen, die sich aufgrund der hohen Grenz-

flächenaktivität an der Grenzfläche zum Fett anreichern, als Emulgator und Stabilisator die Fettverteilung begünstigen und zu den grob dispersen Fleischteilchen Verbindung aufnehmen. Bei der Hitzedenaturierung entsteht somit ein festes Gerüst, das die Fettpartikel und freies Wasser umschließt.

Wenn Brühwürste hohen Erhitzungstemperaturen ausgesetzt werden, kommt es zu starken Schrumpfungen des Eiweißgerüstes, so daß es auch in diesem Fall zu Fett- und Geleeabsatz kommt. Durch Zusatz von Fremdeiweiß kann die Gesamtkapazität der Muskeleiweißkörper entlastet werden, so daß bei bestimmten Fremdeiweißen das Muskeleiweiß in seiner emulgierenden Funktion weniger beansprucht wird und dadurch mehr Muskeleiweiß für die massive Gerüstbildung zur Verfügung steht. Fremdeiweiße wie Sojaprotein zielen allerdings weniger auf die Entlastung der Emulgierung der Fette, da sie selbst zur zusammenhängenden Koagulation befähigt sind, d.h. sich selbst an der Gerüstbildung beteiligen. Auch für Eiklar wurde ein solcher Effekt vermutet. PRÄNDL et al. (79) konnten bei Zusatz von Eiklar zum Brühwurstbrät keine positiven Auswirkungen auf Struktur und Qualität der Produkte feststellen. Nach ihrer Erkenntnis koaguliert Eiklar im Brät infolge des niedrigen pH-Wertes nicht zusammenhängend, vielmehr flockt es unter Wasserabgabe aus. Es wird dabei lediglich in die Wurstmasse eingelagert, ohne an der Verfestigung des Eiweißgerüstes beteiligt zu sein. Auch GÜHNE und SCHMID (26) stellten bei Wurstkonserven, bei deren Herstellung bis zu 3 % Hühnereiklar zugesetzt worden waren, lediglich vorteilhafte Auswirkungen hinsichtlich Saftigkeit und Zartheit der Erzeugnisse fest. Mit diesen wenigen Hinweisen sollte nur angedeutet sein, daß es für den Zusatz von Fremdeiweiß zu Fleisch-Erzeugnissen durchaus gute technologische Gründe gibt, und zwar nicht nur bei

Würsten, sondern auch bei Fleischgerichten nach Küchenart. Bratverluste, z.B. bei Pasteten, waren geringer (14) und die Haltbarkeit höher (62) als bei Erzeugnissen die ohne Sojaeiweiß hergestellt worden waren (6, 89).

Auf der anderen Seite muß jedoch auch festgestellt werden, daß technologische Gründe oft nur vorgegeben werden, um in Wirklichkeit den Ersatz von Fleischeiweiß durch billigere Fremdeiweiße zu begründen.

1.2.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Eiweiße

Proteine (86) sind hochmolekulare organische Stickstoffverbindungen. Sie besitzen amphoteren Charakter und liegen im sauren Milieu als Kationen und im alkalischen Bereich als Anionen vor.

Die Löslichkeit der Proteine ist von Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Dielektrizitäts-Konstante sowie von ihrer Konzentration abhängig (36). Nach JENNESS und PATTON (48) sind für den Grad der Löslichkeit der Proteine einerseits die zwischen den Eiweißmolekülen wirksamen Gitterkräfte, andererseits die zwischen den Eiweißmolekülen und den Molekülen des Lösungsmittels auftretenden Kräfte ausschlaggebend.

Alle polaren Gruppen der Proteine können mit polaren Lösungsmitteln (z.B. Wasser) in Wechselwirkung treten (5). Aufgrund ihres pmphoteren Charakters zeigen Proteine sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich ein Löslichkeitsoptimum. Dazwischen liegt ein Punkt, in dem das Eiweißmolekül gleichviel positive und negative Ladungen trägt und sich somit elektrisch neutral verhält. Dieser Punkt wird als "Isoelektrischer Punkt" (J.P.) bezeichnet (5, 13). Niedrige Konzentrationen von Neutralsalzen wirken, da sie die Ladung der Proteine erhöhen,

löslichkeitserhöhend ("Salting in"), höhere Konzentrationen setzen die Löslichkeit herab ("Salting out"), da sie die Ladung der Proteine erniedrigen (4, 5, 48).

Unter Denaturierung eines Proteins wird die Strukturveränderung verstanden (51), bei der biologische Eigenschaften (z.B. Löslichkeit) stark verändert werden und Veränderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften zu beobachten sind. Die Denaturierung ist meist irreversibel.

Sie entspricht dem Übergang von einem hochgeordneten in einen ungeordneten Zustand (30).

Nach DITTMER (13) sind vor allem die Wasserstoff-Schwefelbindungen von der Denaturierung betroffen, während die Peptidbindungen nicht angegriffen werden. Es wird vermutet, daß die SH-Gruppen, die vorher im Innern des Moleküls verborgen waren, nach außen gelangen und nun reaktionsfähig sind (31).

PUTNAM (80) betrachtet die Denaturierung als eine irreversible physikalische intramolekulare Umlagerung der nativen Proteinstruktur, die nach HAUROWITZ (31) in mehreren Phasen abläuft. In der ersten Phase der Denaturierung findet vermutlich eine intramolekulare Umlagerung der Peptidstruktur statt. In den nachfolgenden Phasen erfolgen Polymerisation und die Bildung von Komplexen zwischen den Eiweißmolekülen und den in den Lösungen vorhandenen Molekülen von Wasser, Anionen, Kationen und ungeladenen Molekülen.

Die Denaturierung von Eiweiß kann durch Hitze, mechanische Kräfte, energiereiche Strahlung, organische Lösungsmittel, anorganische Elektrolyte, Reduktions- und Oxidationsmittel erfolgen (31). Allgemeines Kennzeichen der Denaturierung ist die Aggregation bzw. Koagulation (5, 48, 99).

Die Hitzedenaturierung hängt wesentlich vom pH-Wert der Lösung ab. Die Wirkung der erhöhten Temperatur läßt sich nicht von der der H^+ und OH^- -Ionen unterscheiden.

Die Temperatur, bei der Eiweiße denaturieren ist von der Geschwindigkeit des Temperaturanstieges abhängig. Je rascher man die Temperatur steigert desto niedriger liegt die Denaturierungstemperatur (8, 31). Für den serologischen Nachweis von Proteinen ist der Zusammenhang zwischen Denaturierung, Löslichkeit und serologischer Aktivität von Bedeutung.

Nach SINELL (92) kommt es bei der Erhitzung der Eiweißkörper nach dem Überschreiten eines gewissen Temperaturbereiches in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Temperaturerhöhung und von der Höhe der Temperatur durch tiefgreifende Strukturänderung zur serologischen Reaktionsunfähigkeit.

GRAHAM-SMITH (24) beobachtete beim Erhitzen von Serum auf 64 °C bereits nach 3 Minuten Reaktionsunfähigkeit, während nach LÖFFLER (67) Blut, das eine halbe Stunde auf 150 °C erhitzt wurde, noch Präzipitine bildete.

HAUROWITZ (30, 31) und LANDSTEINER (64) vermuten, daß die nach Hitzeeinwirkung auftretende serologische Spezifität von der Aktivität der denaturierten Gruppe abhängig ist.

SINELL (90, 91) konnte noch auf 120 °C erhitztes Muskeleiweiß vom Rind serologisch nachweisen, ebenso Walfleisch, das 30 Minuten lang auf 100 °C erhitzt worden war.

1.2.3.1 Milcheiweiß

Milcheiweiß wird aus entrahmter Milch nach Verfahren gewonnen, die das Milcheiweiß in seiner Gesamtheit weitgehend von den übrigen Bestandteilen trennen. Die Verordnung über Milcherzeugnisse (Anlage 1) sieht für Milcheiweiß u.a. einen Mindesteiweißgehalt von 70 % vor. Gegenüber dem wasserunlöslichen Milcheiweiß hat das wasserlösliche aufgeschlossene Milcheiweiß einen Eiweißgehalt von mindestens 87 % bei stark reduziertem Milchzuckergehalt (maximal 0,5 %; wasserunlösliches Milcheiweiß 15 %).

Der Aufschluß von Milcheiweiß erfolgt mittels Natrium-, Kalzium- und Kaliumverbindungen der Kohlensäure oder Zitronensäure. In Kasein sind Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor enthalten. Der Phosphor ist durch esterartige Bindungen an die Aminosäuren des Kaseins geknüpft. Kasein ist daher ein Phosphoproteid mit einem Molekulargewicht von 30000 und einem I.P. bei pH 4,6-4,7 (5).

Mittels Elektrophorese kann Kasein in 3 Komponenten, nämlich α, ß- und $\varkappa$-Kasein aufgetrennt werden (43, 72, 88).

Das unfraktionierte Kasein besteht (bezogen auf das Gesamtkasein) nach HIPP (43) zu 75 % aus α-Kasein, 22 % aus ß-Kasein und 3 % aus $\varkappa$-Kasein.

Die α-Fraktion besitzt gegenüber der ß- und $\varkappa$-Fraktion die größte Ionenbeweglichkeit und den höchsten Phosphorgehalt (5, 48).

Kasein löst sich leicht in Alkalien und läßt sich nach Zugabe von Säure wieder ausfällen (5). Es ist äußerst hitzestabil und wird von manchen Autoren als "undenaturierbar" bezeichnet (5, 48, 82).

1.2.3.2 Lactalbumin

Die Milchserumproteine (52) machen etwa 20 % des Milcheiweißes aus. Sie setzen sich aus einer Albumin- (löslich in neutraler halbgesättigter Ammoniumsulfat-Lösung) und einer Globulinfraktion (unlöslich in gesättigter Magnesiumsulfat-Lösung) zusammen. Beim Lactalbumin lassen sich drei relativ homogene Fraktionen, das ß-Lactoglobulin, das α -Lactalbumin und das Blutserumalbumin unterscheiden.

Das ß-Lactoglobulin (48) mit einem Molekulargewicht von 35000 und einem I.P. bei pH 4,8-5,2 macht etwa 50-60 % des Lactalbumins aus.

JENNESS und LARSON (65) unterscheiden ein ß-Lactoglobulin A und ein ß-Lactoglobulin B, die sich in ihrer Löslichkeit und ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit etwas unterscheiden. Die Milch mancher Kühe enthält nur ß-Lactoglobulin A, bei manchen nur -B, bei manchen -A und -B.

Die α -Lactalbuminfraktion (MG 16500, I.P. pH 5,1) zeichnet sich durch einen hohen Tryptophangehalt aus und ist in verdünnten Salzlösungen weniger löslich als das ß-Lactoglobulin.

1.2.3.3 Eiklarproteine

Das Eiklar setzt sich aus Ovalbumin, Conalbumin, Ovoglobulin und den Glykoproteiden Ovomucoid und Ovomucein zusammen. Mit Hilfe einer halbgesättigten Ammoniumsulfatlösung kann das Eiklar in eine lösliche Albumin- und eine unlösliche Globulinfraktion getrennt werden. Mittels der Elektrophorese konnte das kristallisierbare Ovalbumin (MG 45000, I.P. bei 4,6-4,8) in drei, das Conalbumin (MG 87000, I.P. pH 5,8-6,0) in zwei und das Ovoglobulin (MG 14000-17000) in drei (I.P. bei pH 10,5-11,0 sowie bei pH 6,0 und 5,6) Untereinheiten aufgetrennt werden. Der I.P. des Ovomucoids (MG 27000) liegt bei pH 3,9 und 4,5. Das Ovomucein ist wegen seiner Unlöslichkeit noch wenig untersucht (83). Mit Hilfe elektrophoretischer Untersuchungen von Eiklarproteinen verschiedener, z.T. ingezüchteter Hühnerrassen konnten GYLSTORFF, SCHELLNER und SCHETTLER (28) im Polyacrylamid-Gel bis zu 17 verschiedene Proteinfraktionen ermitteln. Aufgrund der unterschiedlichen Elektrophoresemedien wurde von ihnen für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) eine neue Proteingruppeneinteilung getroffen,und zwar in

Region I	Fraktionen mit dem R-Wert (relative Wanderungsgeschwindigkeit)	102 bis 81
Region II	mit dem R-Wert	74-60
" III	" " "	56-53
" IV	" " "	50-43
" V	" " "	40,5-38,5

Die Proteinbanden mit den R-Werten 105, 102, 97, 88, 81, 84, 60, 46,5 , 40,5 , 38,5 und 6 konnten bei allen Eiklaren festgestellt werden. Die Fraktionen der

Region I wurden mittels fraktionierter Aussalzung als Albuminbereich, die der Region V sowohl durch den I.P. als auch durch die Spezialfärbung nach GLICK (22) als Conalbuminbereich definiert.

1.2.3.4 Sojaeiweiß

Der Gesamtproteingehalt der Sojabohne beträgt ca. 40 % (29,6-50,3 %) (84).

MEISL und BÖCKER (71) unterschieden bereits 1889 eine "Albumin"-, sowie eine lösliche und eine unlösliche "Kasein"-Komponente.

Nach OSBORNE und CAMPBELL (75) besteht Sojaprotein zu 80-90 % aus der Globulinfraktion "Glycinin". Sie unterscheiden weiterhin ein lösliches Globulin und ein albuminähnliches Proteid, das "Legumelin".

CLAPP und OSBORNE (76) stellten fest, daß die Aminosäurenzusammensetzung von Glycinin ähnlich der des Kaseins der Milch ist. Elektrophoretisch läßt sich das Glycinin durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat in fünf verschiedene Komponenten auftrennen.

1.2.3.5 Weizeneiweiß

Das Gesamtprotein des Weizens (84) setzt sich zusammen aus 3-5 % Albumin, 6-10 % Globulin, 40-50 % Gliadin und 30-40 % Glutenin. Gliadin und Glutenin werden auch als Klebereiweiß (Gluten) bezeichnet.

Gliadin ist gut löslich in 70 %igem Ethanol. Die Proteine der Gliadinfraktion (29) sind einzelne Polypeptidketten mit einem Molekuargewicht von 36 500. Die I.P. liegen zwischen pH 3,5-7,6. Glutenin löst sich in schwachen Alkalilösungen und besteht aus Polypeptidketten mit etwa 15 verschiedenen Molekulargewichten von 12 000 - 133 000. Die I.P. liegen zwischen pH 4-7.

JONES und Mitarbeiter (49) konnten mittels der Elektrophorese Gluten in sechs verschiedene Komponenten trennen, wovon sie fünf dem Gliadin und eine dem Glutenin zuordneten. Untersuchungen derselben Autoren mit der Stärke-Gel-Elektrophorese erbrachten 8 Gliadinfraktionen, während Glutenin zu groß war, um ins Gel zu wandern.

1.2.4 Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen

1.2.4.1 Serologische Methoden

Bisher bekannte serologische Verfahren zum Nachweis von Fremdeiweißen in Fleisch-Erzeugnissen beruhen auf spezifischen Serumreaktionen, den Antigen (AG) - Antikörper (AK) - Reaktionen (41). Man unterscheidet dabei drei Grundformen:
Agglutination (= Verklumpung), Präzipitation (= Fällung) und Lysis (= Auflösung). Die Präzipitation und die sog. Indirekte Hämagglutination (IH) sind die gebräuchlichsten Methoden.

1.2.4.1.1 Präzipitation

1.2.4.1.1.1 Röhrchenpräzipitation

Die Präzipitation kann als α-Verfahren (konstanter AK, variierendes AG) oder als ß-Verfahren (konstantes AG, variierender AK) durchgeführt werden, wobei dem α-Verfahren im allgemeinen der Vorzug gegeben wird (42).

Für die biologische Eiweißdifferenzierung stellt die Röhrchenpräzipitation seit den Untersuchungen von UHLENHUTH (100) eine brauchbare Methode im Routinebetrieb dar.

SINELL und KLUGE-WILM (93) sowie DEGENKOLB und HINGERLE (12) konnten aufgeschlossenes Milcheiweiß (aME) mittels der Präzipitation in Brühwürsten, die bis auf 105 °C bzw. 100 °C erhitzt wurden, "grob quantitativ" nachweisen.

1.2.4.1.1.2 Agar-Gel-Diffusion

Die Agar-Gel-Diffusion (AGD) ist nach SCHEIBNER (85) und HERRMANN (41) empfindlicher als die Röhrchenpräzipitation.

Die AGD geht auf OUCHTERLONY (77, 78) zurück. Dabei reagieren Antigen und Antikörper in einem halbfesten Agar-Agar miteinander. Bei positiver Reaktion wird der klare Agar durch scharf abgesetzte Präzipitationsbanden getrübt. Man unterscheidet zwischen Einfachdiffusion (es diffundiert nur das AG oder nur der AK) und Doppeldiffusion (AG und AK diffundieren aufeinander zu). Diese Methode wurde inzwischen zu einem Objektträgerverfahren ausgebaut.

HERRMANN und Mitarbeiter (39) gelang mit Hilfe der AGD ein grob quantitativer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Brühwürsten ab Konzentrationen von 1,5 %. Bei höherer Erhitzung (90-95 °C, 30 Min.) konnten sie jedoch erst Konzentrationen ab 3 % erfassen.

APPELQUIST und PERSSON (1) konnten in Handelsprodukten aus zerkleinertem Fleisch Milch- und Ei-Eiweiß mit der Doppel-Diffusionstechnik nach OUCHTERLONY eindeutig nachweisen. Die von den gleichen Autoren untersuchten 12 Produkte mit 1,3 - 9,0 % Sojaproteinzusatz ergaben nur in drei Fällen positive Resultate.

1.2.4.1.2 Immunelektrophorese

GRABAR und WILLIAMS (23) entwickelten eine Kombination von Elektrophorese und Agar-Gel-Diffusion, die Immunelektrophorese.

Das im Agar-Gel zunächst elektrophoretisch aufgetrennte Protein (Antigen) reagiert mit dem senkrecht zur elektrophoretischen Wanderungsachse eingebrachten spezifischen Antiserum. Die Präzipitatbogen sind nach Färbung gut sichtbar.

KLUGE-WILM (54) konnte in Modell-Brühwürsten einen Milcheiweißzusatz ab 0,25 % halb quantitativ nachweisen. In hocherhitzten Produkten gelang jedoch nur ein qualitativer Nachweis.

HERRMANN und KOTTER (40) halten bestenfalls eine "semiquantitative" Aussage für möglich.

1.2.4.1.3 Fluoreszenzmarkierung der Antikörper

COONS und KAPLAN (9) markierten die Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen. Läßt man markierte Antikörper auf einen Gewebeschnitt mit entsprechendem Antigen einwirken, so werden die fluoreszierenden Antikörper vom korrespondierenden Antigen fixiert. Die AG-AK-Komplexe lassen sich fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.

HOLPERT (39, 46) konnte mit dieser Methode aufgeschlossenes Milcheiweiß in Fleischwaren qualitativ nachweisen.

1.2.4.1.4 Hämagglutination

Bei der direkten Hämagglutination werden Erythrozyten durch direkte Einwirkung eines Antikörpers agglutiniert. Bei der Indirekten Hämagglutination (IH) nach SCHMIDT (87) reagieren die Antikörper nicht mit dem primären Erythrozyten-Antigen. Die Reaktion erfolgt vielmehr mit einem Antigen, das vorher adsorptiv an die Blutzellenoberfläche gebunden wurde. Die Erythrozyten stellen gleichsam nur einen Indikator dar, um die AG-AK-Reaktion sichtbar zu machen.

STAVITSKY (97, 98) hält diese Methode für zehnmal empfindlicher und spezifischer als die Präzipitation.

HERRMANN (37, 38, 40) konnte mit der IH Hühnereiweiß ab 1,0 %, aufgeschlossenes Milcheiweiß ab 0,1 % und Sojaprotein ab 0,2 % in hocherhitzten Fleischwaren nachweisen. Eine Differenzierung zwischen aufgeschlossenem Milcheiweiß und Molkenprotein war möglich.

KLUGE-WILM (54) konnte beim Vergleich der Immunelektrophorese mit der IH die Ergebnisse von HERRMANN (38) sowie KOTTER und Mitarbeiter (59) nicht bestätigen.

DEGENKOLB und HINGERLE (11, 12) halten den Aufwand der IH für nicht gerechtfertigt und verwenden dieses Verfahren nur in "strittigen Fällen".

1.2.4.2 Nichtserologische Methoden

KLUGE (53) trennte Kasein kolloidchemisch vom Fleischeiweiß durch langsame Annäherung an den I.P.

KUTSCHER und Mitarbeiter (63) bestimmten Kasein über seinen Phosphoranteil. Sie trennten das Phosphat durch alkalische Verseifung vom Kasein ab und bestimmten die Phosphormenge colorimetrisch. STADELMANN (96) verbesserte dieses Verfahren durch den Einsatz von Ionenaustauschern bzw. durch alkalische Veraschung der Analysenlösung.

ROLLE und KOTTER (58) erfaßten über den Glucosamingehalt nach der modifizierten Elsan-Morgan-Methode Milcheiweiß, Hühnereiweiß und Blutplasma summarisch. Durch zusätzliche Bestimmung von Oxylysin, das nicht in Milcheiweiß vorkommt, konnte dieses einwandfrei ermittelt werden.

VAN BAAL und LEGET (2) führten den Nachweis von Kasein mittels Papierelektrophorese durch.

HENDREY (35) wies Sojabohnenmehl in Fleisch-Erzeugnissen über dessen nicht vergärbare Zucker nach.

BAILEY (3) bestimmte den Zusatz von Sojabohnenmehl in Fleisch-Erzeugnissen durch Nachweis von Glycenin.

Um isoliertes rohfaserfreies Sojaeiweiß nachweisen zu können, muß diesem Produkt in den USA bei der Herstellung 0,1 % Titandioxid zugesetzt werden (73).

1.2.5 Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen

Verschiedene Autoren extrahierten Fremdeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen mit physiologischer Kochsalzlösung, wobei Extraktionsmittelmenge, -dauer und -temperatur unterschiedlich sind.

Als Extraktionsmittel wurden verschiedene Puffer (Barbital-, Veronalpuffer u.a.) verwendet (17, 18, 19, 27, 61, 93).

DEGENKOLB und HINGERLE (12) bestimmten vor der Extraktion Fett- und Wassergehalt und errechneten daraus die erforderliche Menge Extraktionsmittel.

KOTTER und HERRMANN (37, 59, 61) sowie GERIGK und KRÜGER (19) lyophilisierten das Untersuchungsmaterial vor der Extraktion. Sie halten u.a. bei höher erhitztem Material vor der Extraktion eine Lyophilisation für notwendig.

Für den elektrophoretischen Fremdeiweißnachweis verwandten OLSMAN und Mitarbeiter (73) sowie FREIMUTH und KRAUSE (16) 8 m-Harnstofflösung bzw. 8 m-Gelpuffer, teilweise auch Harnstoff-Borat-Puffer.

Mit Natriumdodecylsulfat (SDS) extrahierten HOFMANN und PENNY (45) die Eiweiße für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

1.2.6 Elektrophorese

1.2.6.1 Allgemein

Nach MAURER (69) wird die Elektrophorese allgemein definiert als ein Vorgang, bei dem ein elektrisch geladenes Teilchen der Ladung Q in einem viskösen Medium (Gel oder Flüssigkeit) durch Einwirkung eines elektrischen Feldes E (Potentialgefälle) zur Wanderung veranlaßt wird.

Folgende Parameter bedingen die elektrophoretische Wanderung der Teilchen bzw. beeinflussen sich auch gegenseitig (69):

Größe, Molekulargewicht, Gestalt, Konzentration, elektrische Ladung, Hydratation und Dissoziationsgrad des Teilchens

Viskosität, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Mediums

elektrische Feldstärke, Elektrophoresezeit und Länge der Trennstrecke.

Aufgrund des amphoteren Charakters der Proteine wandern diese im sauren Milieu als Kationen, im alkalischen als Anionen. Bei der Auftrennung ist die wirksame Ladung und damit die Wanderungsrichtung vom pH-Wert des Mediums abhängig (5).

Die Teilchenbeweglichkeit ergibt sich aus dem Quotienten von Geschwindigkeit und Feldstärke und ist unter anderem abhängig von pH-Wert und Ionenstärke des Mediums. Der Dissoziationsgrad des Elektrolyten, (schwache Säure oder Base) bestimmt vor allem die Nettoladung und damit die Nettobeweglichkeit der Teilchen (25).

1.2.6.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Als Medium dient bei dieser Elektrophorese-Variante ein Polyacrylamid-Gel. Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) ist das Polymerisations- und Vernetzungsprodukt des Acrylsäureamids (CH_2 = CH - CO - NH_2) und eines Vernetzers, gewöhnlich N, N'-Methylenbisacrylamid (BIS) (CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH_2). Das dreidimensionale Maschenwerk des Gels wird durch Vernetzen der Polyacrylamidketten, die sich Seite an Seite aneinanderlegen, gebildet (Prinzip der Vinylpolymerisation).

Die Konzentration von Acrylamid und BIS in der Gellösung und damit zusammenhängend der Polymerisations- (Kettenlänge) und der Vernetzungsgrad bestimmen Dichte, Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels.

Elastische und völlig transparente Gele erhält man, wenn das Mengenverhältnis Acrylamid zu BIS etwa 30 : 1 beträgt, wobei die Acrylamid-Konzentration über 3 % liegen muß.

DAVIES (10) konnte in seinen Untersuchungen zeigen, daß mit dem Anstieg der Acrylamidkonzentration ein Abfall der Bisacrylamidkonzentration erfolgen muß, wenn man elastische Gele erhalten will.

Die durchschnittliche Porengröße des PAA-Gels ist für den Molekularsiebeffekt ausschlaggebend. Die Dichte des Gelgitterwerkes, die von der Konzentration sowie vom Polymerisations- und Vernetzungsgrad abhängig ist, bestimmt die Porengröße (69).

1.2.6.3 Kontinuierliche und diskontinuierliche (Disk-) Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

RAYMOND und WEINTRAUB (81) sowie HJERTEN und Mitarbeiter (44) arbeiten bei der kontinuierlichen Elektrophorese mit PAA-Gel als Trägersubstanz unter Verwendung von homogenen Puffersystemen mit einheitlichem pH-Wert. Bei der Disk-Elektrophorese (D.E.) nach ORNSTEIN (74) und DAVIES (10) handelt es sich um ein System mit PAA-Gel als Trägersubstanz, aber mit unterschiedlichen pH-Werten, unterschiedlicher Pufferzusammensetzung und Gel-Konzentration. Diese Diskontinuitäten erzeugen sehr schmale, d.h. hoch konzentrierte Startzonen, die für eine hohe Trennschärfe entscheidend sind.

Drei physikalische Erscheinungen sind für das hohe Auflösungsvermögen in der D.E. verantwortlich:

Konzentrations-, Molekularsieb- und Nettoladungseffekt.

1.2.6.3.1 Konzentrations- und Molekularsiebeffekt

In der Flüssigkeitselektrophorese, wie z.B. in der Papierelektrophorese, werden elektrisch aufgeladene Teilchen ausschließlich entsprechend ihrer Nettoladung aufgetrennt. Gele besitzen einen hohen Viskositätsgrad und Reibungswiderstand. Werden sie als Trägersubstanzen verwendet, wird die Diffusion eingeschränkt und eine Konvektion verhindert. Die elektrophoretische Wanderung der aufzutrennenden elektrisch geladenen Teilchen wird dann von ihrer Molekulargröße abhängig (69).

Im PAA-Gel werden die Teilchen dementsprechend nicht nur nach ihrer elektrischen Ladung getrennt, sondern sie werden auch nach Molekülgröße und Form "ausgesiebt".

SMITHIES (94) bezeichnet diese Erscheinung als "molecular sieving effect". Die Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens durch das Gelnetzwerk ist nach ORNSTEIN (74) und SMITHIES (94) von der Acrylamidkonzentration abhängig. Der durchschnittliche Porendurchmesser eines Gels ist umgekehrt proportional zur Wurzel aus der Volumenkonzentration des Polymers vom Molekuldurchmesser (69).

Die Proteine werden, der sogenannten "beharrlichen Funktion" von KOHLRAUSCH (55) folgend, vor ihrer Auftrennung zu einer möglichst schmalen Startzone zusammengedrängt. Voraussetzung dafür ist, daß in verschiedenen Zonen des Gels durch unterschiedlichen pH-Wert eine erhöhte Leitfähigkeit für Anionen und Kationen gegeben ist.

Eine Konzentrierung der Proteine erreicht man auch dadurch, daß die Probe in einem Puffer gelöst wird, der eine geringere Ionenstärke besitzt als das zu trennende Medium. Die Probelösung hat dann eine geringere Leitfähigkeit (44).

1.2.6.4 Physikalisch-chemische Vorgänge

Die beiden Ionenarten, die während der Elektrophorese in Trennrichtung mit den Probenteilchen wandern und den Regulationseffekt nach KOHLRAUSCH (55) erzeugen, werden von MAURER (69) als Leit- und Folgeionen bezeichnet. Bei Beginn der Elektrophorese befinden sich die Leitionen in allen Gelteilen, während die Folgeionen nur im Elektrodenpuffer vorhanden sind. Wählt man einen geeigneten pH-Wert für die Gele, so stellen sich die Beweglichkeiten aller Ionenarten in folgender Reihenfolge ein:

Die Leitionen bewegen sich unter Stromeinfluß schneller als die Proteine. Sie eilen diesen und den Folgeionen voraus und lassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit hinter sich. Diese Zone hinter den Leitionen hat eine höhere Feldstärke (die spezifische Leitfähigkeit ist umgekehrt proportional zur Feldstärke), die die Proteine und Folgeionen beschleunigt und sie hinter den Leitionen mit derselben Geschwindigkeit wandern läßt. Alle Ionenarten bewegen sich mit derselben Geschwindigkeit, wenn die Produkte aus Feldstärke und Beweglichkeit gleich sind.

Zwischen den Leit- und Folgeionen bildet sich eine Grenzschicht, die die Grenze zwischen hoher und niedriger Feldstärke darstellt. Diese Grenzschicht wandert schnell durch das Proben- und das Sammelgel. Die zu trennenden Proteine sammeln sich aufgrund der unterschiedlichen Beweglichkeiten zwischen Leit- und Folgeionen hinter der wandernden Grenzschicht und werden zu einer schmalen hochkonzentrierten Zone zusammengedrängt. Sobald die

wandernde Proteinzone, eingezwängt zwischen Leit- und Folgeionen, die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hat, wird infolge des veränderten pH-Wertes und der Porengröße der Dissoziationsgrad der Folgeionen um ein Vielfaches gesteigert. Die Folgeionen überholen dann die Proteine und bewegen sich hinter den Leitionen. Die Proteine werden sodann bei einheitlicher Feldstärke und einheitlichem pH-Wert in einer "echten Zonenelektrophorese" aufgetrennt.

1.2.6.5 Tierartspezifische Eiweißdifferenzierung mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

HEINERT und KLINGER (32) haben im Rahmen der tierartspezifischen Eiweißdifferenzierung mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese in einem genau definierten Gel die Eiweiße von Rind und Schwein auf Grund der spezifischen Proteinbanden unterschieden. Die Proteinmuster von Rind und Schwein zeigten hinsichtlich Lage, Ausdehnung und Anfärbbarkeit der Banden ein unterschiedliches Bild.

In einem Gemisch von Rinder- und Schweineskelettmuskulatur konnten die Eiweiße auf Grund ihrer charakteristischen Banden der entsprechenden Tierart zugeordnet werden. Die Muskelproben waren allerdings nicht erhitzt worden.

Bei artverwandten Tieren wie Reh und Rothirsch zeigten die Proteinmuster bei der PAGE nur geringe Unterschiede. Daher benutzten HEINERT und KLINGER (33) zur weiteren Differenzierung die Enzymspektren der Esterasen.

Bei vertikaler Plattentechnik unter exakt eingehaltenen Versuchsbedingungen sind, wie in der Arbeit (33) beschrieben, die Protein- und Esterasemuster typisch für die jeweiligen Tierarten. Die Autoren haben mit dieser Technik über 120 verschiedene Haustier-, Wildtier- und Fischarten untersucht. Eine Differenzierung zwischen Haus- und Wildschwein sowie Haus- und Wildkaninchen war nicht möglich. Anscheinend sind bei diesen Tierarten, auf Grund ihrer nahen Verwandschaft, die Eiweißmuster weitgehend identisch und mit dieser Methode nicht mehr differenzierbar.

In den Untersuchungen von MÄKINEN, DE WREEDE, STEGEMANN und HEINERT (70) mittels der Na-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; SDS = Sodiumdodecylsulfat) zeigten die Muskelproteine von Rind, Schwein, Huhn und Pute ein sehr ähnliches Bandenmuster, das speziesdifferenzierend kaum ausgewertet werden konnte.

Native und auf 100 ^{o}C erhitzte Fleischproben wiesen in der SDS-PAGE nahezu identische Banden auf, bei der PAGE waren die Banden der erhitzten Proben nicht nachweisbar.

Die Vorteile des SDS-PAGE liegen also in der Möglichkeit hitzedenaturierte Proteine zu erfassen, wobei allerdings eine Artendifferenzierung nicht möglich ist.

KAISER, MATHEIS, KMITA-DUERRMANN und BELITZ (50) untersuchten wäßrige Extrakte aus Skelettmuskeln von 31 Tierarten (14 Warmblütler, 17 Kaltblütler) durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), isoelektrische Focussierung im Polyacrylamidgel (PAGIF) und im Agarosegel (AGIF).

Für die Identifizierung der Warmblütler sind die Focussiermethoden (PAGIF, AGIF) als Methode der Wahl anzusehen, während für die Kaltblütler die PAGE ausreicht.

PAGIF und AGIF erlauben neben der Tierartbestimmung auch eine Differenzierung nach Alter und Geschlecht, was u.a. bei Rind, Schaf und Huhn nachgewiesen wurde. PAGIF-Pherogramme sind von den drei untersuchten Methoden am besten zur densitometrischen Auswertung und damit zu quantitativen Aussagen bei Fleischmischungen geeignet.

1.2.6.6 Der Nachweis von Fremdeiweißen in Fleisch-Erzeugnissen mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

FREIMUTH und KRAUSE (16) versuchten Bindemittel auf Milcheiweißbasis in Fleisch-Erzeugnissen mit Hilfe der PAA-Gel-Elektrophorese nachzuweisen. Mittels 8 %igem PAA-Gel mit Harnstoff-Borat-Puffer nach SMITHIES (94) konnten sie zugesetztes Milcheiweiß aufgrund seiner typischen Kaseinbanden (α-u. ß-Kasein) identifizieren und semiquantitativ erfassen.

SPELL (95) konnte in Fleisch-Erzeugnissen, die bis auf 120 ^{o}C erhitzt worden waren, mit Hilfe der vertikalen Disk-Elektrophorese neben Sojaeiweiß auch zugesetztes aufgeschlossenes Milcheiweiß in Konzentrationen von weniger als 2 % nachweisen.

LOTZ, HERRMANN und WEIGERT (68) berichten über die qualitative und quantitative Bestimmung von zugesetztem aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Die einzelnen Banden wurden dabei densitometrisch ausgewertet.

FEIST (15) konnte mittels der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in Fleisch-Erzeugnissen, die auf 70 °C erhitzt worden waren, zugesetztes aufgeschlossenes Milcheiweiß ab einer Konzentration von 0,5 % eindeutig nachweisen. Er stellte in Extrakten aus hocherhitztem Untersuchungsmaterial eine Verstärkung der Kaseinbanden fest und führte dies auf eine völlige Denaturierung des Fleischeiweißes zurück.

HOFMANN und PENNY (45) beschreiben eine Methode zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiß mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. In Abhängigkeit von ihren Molekulargewichten wanderten die von den SDS-Ionen umhüllten Eiweißmoleküle, deren elektrische Ladung dadurch gleich wird, zur Anode. Zwischen den Laufstrecken und dem Logarithmus der Molekulargewichte der Proteine besteht eine lineare Beziehung, die eine Identifizierung der Proteine und Bestimmung ihrer Molekulargewichte erlaubt. Diese Methode soll auch bei erhitzten Erzeugnissen anwendbar sein.

HELFERAD (34) konnte zugesetztes Sojaeiweiß und Na-Kaseinat in Fleisch-Erzeugnissen, die 45 Minuten auf 115 °C erhitzt worden waren, mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in allen Proben nachweisen. Na-Kaseinat zeigte dabei die gleichen Banden wie das aus der Milch stammende Kasein.

HOMAYOUNFAR (47) konnte ebenfalls mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zugesetztes Sojaeiweiß in Erzeugnissen auf Fleischgrundlage infolge der charakteristischen Banden ermitteln. 24 Minuten Hitzebehandlung bei 127 °C störte den Nachweis der pflanzlichen Proteine nicht. Es fehlen jedoch Mengenangaben über das zugesetzte Sojaprotein.

LEE und Mitarbeiter (66) untersuchten frische und gekochte Fleisch-Sojaeiweiß-Mischungen mit der Disk-Elektrophorese. Sie extrahierten die Produkte mit SDS-Elektroden-Puffer unter Zusatz von 1 % Mercaptoethanol. Je nach Denaturierungsgrad traten in reinen Sojaeiweißlösungen 4 bis 5 Banden auf, von denen sich bei einem Mischungsverhältnis von 2 Teilen Fleischprotein zu 1 Teil Sojaprotein 2 Banden anfärben ließen.

FROUIN und Mitarbeiter (18) konnten in Extrakten aus erhitzten Fleisch-Erzeugnissen, denen Sojaprotein zugesetzt worden war, mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese stets zwei Banden nachweisen. In nicht erhitzten Erzeugnissen traten vier Banden auf.

VAN GILS und HIDSKES (21) wiesen Kasein, Sojaeiweiß und koaguliertes Eiklar in Fleisch-Erzeugnissen mit der Elektrophorese auf Zellulose-Acetat-Membranfiltern nach. Für Kasein und Sojaprotein wurde eine untere Nachweisgrenze von 0,1 %, für Eiklar von 0,5 % angegeben.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Geräte und Chemikalien für die Polyacrylamid-Gel-(Disk-)Elektrophorese

2.1.1. Geräte

Die Untersuchungen wurden mit dem Elektrophoresegerät System HAVANA (Fa. Desaga, Heidelberg) durchgeführt.

Die Gele wurden in zwei Doppeltrennzellen aus Quarzglas mit einer Trennstrecke von 110 mm gegossen. Die Gelstärke betrug 1,5 mm, der Probenaufgaberaum war auf 3,5 mm erweitert. Es wurden Profilformer für 24 und 48 Geltaschen verwendet. In die Trenneinheit konnten maximal zwei Doppeltrennzellen gleichzeitig eingesetzt werden. Als Stromversorgung stand das Netzgerät Modell 4100 Pulsed Constant Power Supply (Firma Ortec) und für die photometrische Auswertung der Gele das "Cellomatic" Densitometer (Fa. Serva, Heidelberg) zur Verfügung.

2.1.2. Chemikalien

Acrylamid reinst, N-, N'-Methylenbisacrylamid (BIS-),
Tetramethylethylendiamin (TEMED), Ammoniumpersulfat (Per),
Tris-(hydroxylmethyl-) aminomethan (Tris),
Glycin, Bromphenolblau
Coomassie Brillant Blue R 250,
Trichloressigsäure, 1 n Salzsäure
1 n Schwefelsäure; Essigsäure, konz,
Ethanol, absolut

2.2. Arbeitsvorgang

2.2.1. Herstellung der Reagenzien

Beim Umgang mit Acrylamid ist äußerste Vorsicht geboten, da es sehr toxisch ist. Das Pipettieren der Reagenzien sollte grundsätzlich nur mit einer automatischen Pipette oder mit einem Pipettierhilfsmittel erfolgen.

Die Persulfatlösung ist jede Woche frisch anzusetzen. Die Acrylamidlösungen können über mehrere Wochen hinweg ohne negativen Einfluß auf die Polymerisation der Gele verwendet werden. Die Reagenzien für die Gelherstellung sind bei Kühlschranktemperatur zu lagern.

Die einzelnen Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Elektrodenpuffer pH 8,3

Tris	6,0	g
Glycin	28,8	g
aqua dest	ad 1000	ml

Trenngellösungen

Lösung 1:

1 n Salzsäure	48,0	ml
Tris	36,6	g
TEMED	0,23	ml
aqua dest	ad 100	ml

Lösung 2:

Acrylamid		30,0	g
BIS		0,8	g
aqua dest.	ad	100	ml

Gelpuffer 1 b; pH 9,0, 1,5 m:

Tris		36,3	g
1 n Schwefelsäure		62,0	ml
TEMED		0,48	ml
aqua dest.	ad	200	ml

Gelpuffer 2 b; pH 9,0, 0,3 m:

Gelpuffer 1 b		20	ml
TEMED		0,19	ml
aqua dest.	ad	100	ml

Acrylamidlösung 32 %ig:

Acrylamid		54,4	g
BIS		1,8	g
aqua dest.	ad	115	ml

Ammoniumpersulfatlösungen 0,21 %ig und 0,14 %ig:

Per		0,21	g
aqua dest.	ad	100	ml

Per		0,14	g
aqua dest.	ad	100	ml

Trenngellösung:

Lösung 1 (1 Teil)	4,0	ml
Lösung 2 (2 Teile)	8,0	ml
Per 0,14 %ig (4 Teile)	10,0	ml
aqua bidest. (1 Teil)	4,0	ml

Sammelgellösung:

32 %ige Acrylamidlösung	0,7	ml
Puffer 2 b	1,6	ml
Per 0,21 %ig	1,2	ml
aqua bidest.	2,9	ml

Probengellösung:

32 %ige Acrylamidlösung	3,0	ml
Puffer 2 b	3,0	ml
Per 0,21 %ig	6,0	ml

Bromphenolblaulösung:

0,001 %ig in aqua dest.

Fixierungslösung:

Trichloressigsäure	12,5	ml
aqua dest.	ad 100	ml

Färbelösung:

Coomassie Brillant Blue R 250	0,9	g
Ethanol absolut	450	ml
Essigsäure konz.	100	ml
aqua dest.	ad 1000	ml

Entfärbelösung:

Essigsäure konz.	37,5	ml
aqua dest.	ad 1000	ml

2.2.2. Vorbereitung der Trenneinheit

Die Trennzelle wurde gereinigt und danach zusammengesetzt. Die zerlegbare Doppeltrennzelle war auf den Innenseiten vorteilhaft mit Ether zu entfetten. (Beim Zusammenschrauben der Trennzelle war Vorsicht geboten. Das Glas der Trennzelle zerspringt leicht bei einseitiger Druckanwendung). Die Unterseite der Trennzelle ist mit Tesafilm abgedichtet worden, um ein Auslaufen von Gellösung zwischen Gummiunterlage des Polymerisationsständers und Zelle zu vermeiden.

2.2.3. Gießen des Gels

Nach dem Einspannen der Trennzelle in den Polymerisationsständer wurde mit einer sterilen 20 ml Injektionsspritze Trenngellösung bis zu einer Höhe von ca. 8 cm in die Kammern eingefüllt. Die Lösung wurde zur Vermeidung von Luftblasen am seitlichen Rand der Trennzelle eingefüllt. Um einer Meniskenbildung vorzubeugen, wurde die Geloberfläche ca. 2 mm hoch mit aqua dest. überschichtet. (Das aqua dest. darf sich dabei nicht mit der Trenngellösung vermischen.)

Nach erfolgter Polymerisation (ca. 40 Min. bei Tageslicht) wurde der Wasserüberstand mit einer Spritze abgesaugt und die Geloberfläche mit Filterpapier vorsichtig getrocknet.

In der gleichen Weise wurde beim Einbringen des Sammelgels (Höhe 1,5 cm) verfahren, das nach etwa 25 Min. polymerisierte. In das darüber gegoßene Probengel (Polymerisationszeit ca. 8 Min.) wurde ein Profilformer

gebracht, der pro Gel 12 (wahlweise 24) Geltaschen formte. Der Profilformer wurde mit leichten Zug- und Wippbewegungen aus dem Probengel entfernt, um ein Zerreissen der Probentaschen bzw. ein Loslösen des Gels von der Glaswand zu vermeiden. Die in den Probentaschen nicht polymerisierte Flüssigkeit wurde mit Filterpapierstreifen abgesaugt.

2.2.4. Auftragen der Proben

In die getrockneten Geltaschen wurden die zu untersuchenden Proben mit Eppendorf-Pipetten eingefüllt und mit Probengellösung bis kurz unter den oberen Rand der Probentaschen so überschichtet, daß sich die Probengellösung nicht mit den aufgetragenen Proben vermischte.

2.2.5. Zusammensetzen der Trennkammer

Nach der Polymerisation der letzten Gelschicht wurde die Doppeltrennzelle aus dem Polymerisationsständer entnommen, der Tesafilm von der Unterseite entfernt und in die Halterung der Trenneinheit eingespannt, die mit 5 l Elektrodenpuffer, pH 8,3, gefüllt wurde. Zur Sichtbarmachung der wandernden Grenzschicht wurden zum Puffer 2 ml 0,001 %ige Bromphenolblaulösung gegeben. Zur Vermeidung resp. zur Verminderung einer Wärmekonvektion wurde das Kühlsystem an die Wasserleitung angeschlossen und die Umwälzpumpe, die zusätzlich eine gute Durchmischung des Puffers gewährleistet, eingeschaltet.

2.2.6. Auftrennung und Entnahme des Gels

Nach erfolgter Auftrennung (ca. 3 Std.) wurde der Arbeitsblock aus der Elektrophoresekammer entnommen und geöffnet.

Um die Wandhaftung des Gels zu lockern, wurde die Zelle mit dem Gel unter fließendes Wasser gehalten und die oben liegende Glasplatte unter leichtem Druck mittels Plastikscheibe abgehoben. Proben- und Sammelgel wurden nun abgeschnitten und das Trenngel vorsichtig (Bruchgefahr!) mit einer Plastikscheibe von der Glasplatte abgelöst.

2.2.7. Fixierung der Proteinbanden

Zur Fixierung der Proteinbanden wurde das Gel 30 Min. bei Zimmertemperatur in 12,5 %ige Trichloressigsäure gelegt und anschließend 5 Minuten gewässert.

2.2.8. Färbung des Gels

Die Färbung des Gels erfolgte in 0,09 %iger alkoholischer Coomassie Brillant Blue-R 250-Färbelösung im Schüttelwasserbad bei 65 ^{o}C über 25 Minuten.

2.2.9. Entfärbung des Gels

Beim Färbevorgang wurden Gel und Proteinbanden gleichermaßen gefärbt. Durch das Einlegen des Gels in 3,75 %ige Essigsäure wurde das Gel 24 Std. wieder entfärbt, während die Färbung der Proteinbanden erhalten blieb.

2.2.10. Densitometrische Auswertung

Die Polyacrylamidgele wurden ohne weitere Behandlung einer photometrischen Auswertung unterzogen.

Bei dem verwendeten "Cellomatic" Densitometer wurden die Gele entlang der Laufspuren der einzelnen Proben an einer Lichtquelle vorbeigeführt, die Extinktionen gemessen und mit einem Schreiber als Kurve aufgezeichnet (Densitogramme). Nach der Auswertung wurden die Gele in 10 %iger Essigsäure aufbewahrt.

2.3. Vorversuche

2.3.1. Gelsystem

Zunächst wurde das Gelsystem, das KOLB (56) zur Untersuchung des Enzymmusters der menschlichen Haut verwendet hatte und mit dem FEIST (15) aufgeschlossenes Milcheiweiß (aME) in erhitzten Brühwürsten nachweisen konnte, verwendet. Dieses Gelsystem bestand aus 8 bzw. 6 %igem Trenngel. Die Sammel- bzw. Probengelkonzentration betrug 3,5 % bzw. 8 %.

In weiteren Versuchen wurden Trenngele mit verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen auf ihre Eignung geprüft. Dabei erwies sich das von MAURER (69) vorgeschlagene Trenngel Nr. 1, das sich für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10^4 bis 10^6 eignet, als das System der Wahl. Beim Sammelgel

dieses Systems war jedoch keine zufriedenstellende Polymerisation zu erreichen. Es wurde daher das von KOLB (56) und FEIST (15) verwendete Sammel- und Probengel verwendet. Im Unterschied dazu wurde mit einem einheitlichen Trenngel von 7,5 % bei kontinuierlichem pH-Wert von 8,9 gearbeitet.

2.3.2. Stromstärke und Spannung

Zur Ermittlung optimaler Bedingungen wurden sowohl Stromstärke als auch Spannung variiert. Bei konstanter Stromstärke von 80 mA betrug die Trennzeit ca. 3 Std. und erbrachte die besten Ergebnisse. Die Spannung stieg dabei von 80 V auf 220 V an.

2.3.3. Ermittlung der aufzutragenden Probenmengen

Die Proben wurden in unterschiedlichen Mengen mit Eppendorf-Pipetten aufgetragen. Eine Auftragsmenge der 1 %-Lösungen der Reinsubstanzen von 10 µl für aME und Eiklar sowie 30 µl für Sojaeiweiß, Lactalbumin und Gluten erbrachte die besten Ergebnisse. Bei den Wurstextrakten ergab sich als Auftragsoptimum eine Menge von 30 µl.

2.4. Hauptversuch

2.4.1. Verwendete Reinsubstanzen

Im Rahmen der Untersuchungen wurden im Handel erhältliches aufgeschlossenes Milcheiweiß (aME), Sojaeiweiß, Aleuronat B (Weizeneiweiß) und Lactalbumin sowie frisches Hühnereiklar verwendet. Davon wurden 1 %ige wäßrige Lösungen hergestellt, einige Sekunden mit dem Ultra-Turrax gut durchmischt und auf 40 °C, 70 °C und 120 °C erhitzt.

2.4.2. Zusammensetzung der Modellwürste

Für die Untersuchungen wurden Modellwürste mit definierten Zusätzen an Fremdeiweißen hergestellt.

Die Grundrezeptur hatte folgende Zusammensetzung:

50 % Rindfleisch
25 % Speck
25 % Eis

Bezogen auf die Fleisch-/Fettmenge wurden 2,0 % Nitritpökelsalz und 0,3 % Diphosphat und bezogen auf das Gesamtbrät 0,05 % Na-Ascorbat, 0,5 % Kristallpur und 0,4 % einer Gewürzmischung zugesetzt.

Die Grundrezeptur diente zugleich als Kontrollcharge. In das Gesamtbrät wurden die zu untersuchenden Fremdeiweiße (aufgeschlossenes Milcheiweiß mit einem Rohproteingehalt von 87 %, Hühnereiklareiweiß auf einen Rohproteingehalt von 100 % umgerechnet, Sojaeiweiß mit einem Rohproteingehalt von 85 %, Lactalbumin mit einem Rohproteingehalt von 75 % und Weizeneiweiß mit einem Rohproteingehalt von 82,4 %) in Konzentrationen von jeweils 0,5; 1,0 und 2,0 % bezogen auf die Gesamtmenge eingekuttert.

Ein Teil der Modellwürste wurde auf 70 °C, der andere auf 120 °C erhitzt.

2.4.3. Extraktion von Fremdeiweiß aus den Modellwürsten

Das Probenmaterial wurde vor der Untersuchung lyophilisiert. 7,5 g Lyophilisat wurden mit 12,5 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) und 4 ml aqua dest. vermischt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Der pH-Wert wurde mit Natronlauge bzw. Salzsäure auf pH 8,0 bis 8,2 eingestellt. Anschließend wurde im Brutschrank bei 40 °C für ca. 2 Std. inkubiert.

Nach der Inkubation wurde 15 Min. bei 4500 U/Min. zentrifugiert und der opaleszierende Überstand filtriert. Das Filtrat wurde für die Elektrophorese verwendet.

E R G E B N I S S E

Densitogramme der untersuchten Reinsubstanzen in einprozentigen Lösungen bei verschiedenen Erhitzungsstufen (40 °C, 70 °C, 120 °C)

Abb. 1.: Aufgeschlossenes Milcheiweiß in 1 %-igen wäßrige Lösungen

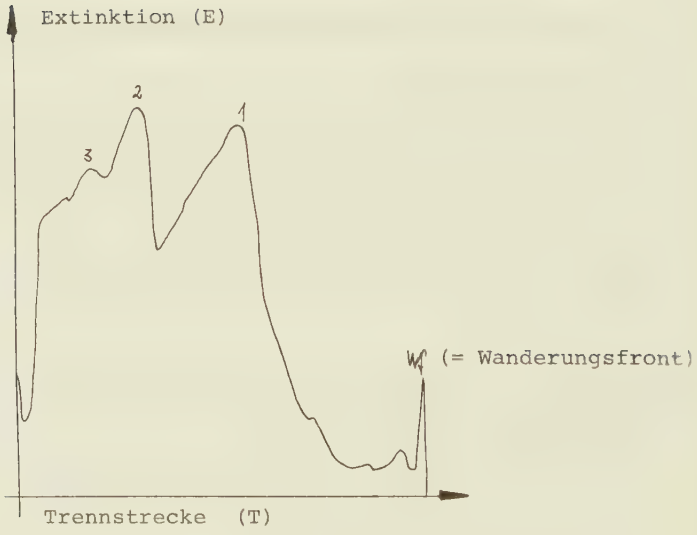


Abb. 1.1.: Erhitzt auf 40 °C

Abb. 1.2.: Erhitzt auf 70 °C

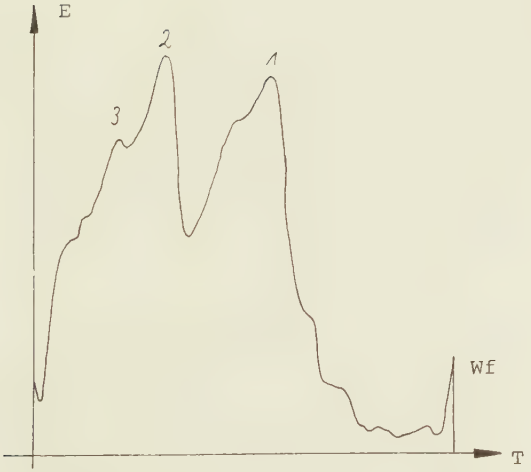


Abb. 1.3.: Erhitzt auf 120 °C

Die Densitogramme der 1 %-igen aME-Lösungen, die auf verschiedene Temperaturstufen erhitzt worden waren, unterschieden sich nur unwesentlich, wie Abb. 1 zeigt. Auch nach Erhitzung auf 120 °C war eine Denaturierung von aufgeschlossenem Milcheiweiß elektrophoretisch noch nicht nachweisbar. Es ließen sich drei Banden unterscheiden, von denen zwei Banden (α-und ß-Kasein) am deutlichsten hervortraten.

Zur Lokalisierung der einzelnen Banden wurde der Abstand der Spitze des entsprechenden Peaks von der Wanderungsfront (Wf) in Verhältnis zur Gesamtwanderungsstrecke gesetzt.

Für die Banden von aME ergaben sich folgende Rf-Werte (Gesamtwanderungsstrecke jeweils dividiert durch den Abstand vom Peak zur Wanderungsfront).

Bande:	1:	2,26
	2:	1,45
	3:	1,20

Abb. 2.: Densitogramme von nativem Eiklar in 1 %-igen wäßrige Lösungen

Abb. 2.1.: Erhitzt auf 40 °C

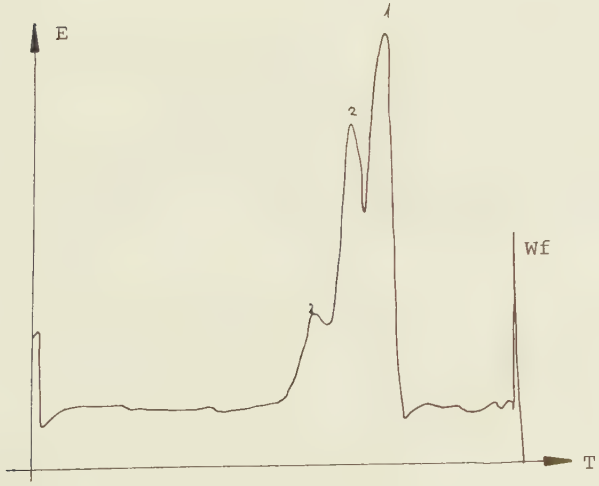


Abb. 2.2.: Erhitzt auf 70 °C

Abb. 2.3.: Erhitzt auf 120 °C

Auf 40 °C erhitztes natives Eiklar zeigte 6 Banden, die auf 70 bis 120 °C erhitzten Eiklarlösungen nur 3 Banden. Bei den höher erhitzten Lösungen denaturierten drei Proteinfraktionen anscheinend schon bei relativ niedrigen Temperaturen und waren elektrophoretisch nicht mehr nachweisbar.

Rf-Werte:	1:	3,32;	2:	2,67;	3:	2,24;
	4:	1,56;	5:	1,28;	6:	1,12.

Abb. 3.: Densitogramme von Sojaeiweiß (Sojamin R) in 1 %-igen wäßrige Lösungen

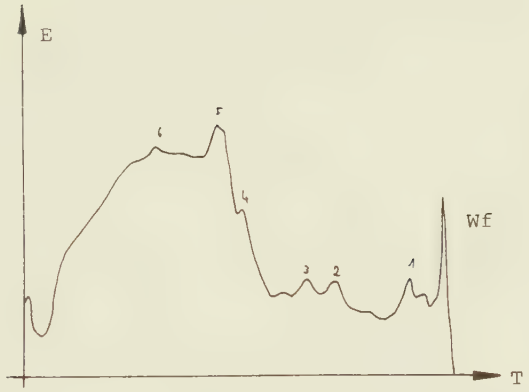


Abb. 3.1.: Erhitzt auf 40 °C

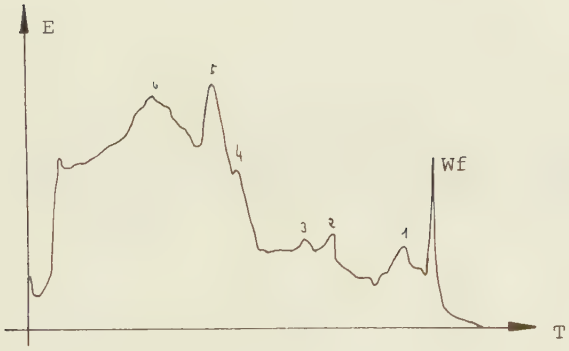


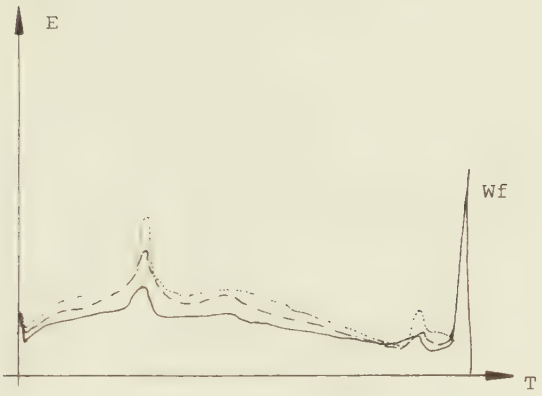
Abb. 3.2.: Erhitzt auf 70 °C

Abb. 3.3.: Erhitzt auf 120 °C

Die Densitogramme von Sojaeiweiß bei verschiedenen Erhitzungsstufen (40, 70 und 120 °C) zeigten keine wesentlichen Unterschiede. Es traten 6 Peaks mit folgenden Rf-Werten auf:

1:	13,09;	2:	3,85;	3:	3,27;
4:	2,05;	5:	1,84;	6:	1,44.

Abb. 4.: Densitogramm von Lactalbumin in 1 %-iger Lösung



_____ Lactalbumin auf 40 °C erhitzt
..... Lactalbumin auf 70 °C erhitzt
-.-.- Lactalbumin auf 120 °C erhitzt

Lactalbumin zeigte bei allen Erhitzungstemperaturen im wesentlichen das gleiche Bild mit 2 Peaks mit Rf-Werten von 7,4 (1) und 1,3 (2).

Abb. 5.: Densitogramme von Aleuronat (Weizeneiweiß) in 4 %-iger Lösung

Abb. 5.1.: Erhitzt auf 40 °C

Abb. 5.2.: Erhitzt auf 70 °C

Die Banden von Weizeneiweiß traten in 1 %-iger Lösung nicht deutlich hervor. Erst ab einer Konzentration von 4 % ließen sich 4 Peaks unterscheiden, wie die Densitogramme zeigen.

Abb. 6.: Aufgeschlossenes Milcheiweiß in 1 %-iger wäßriger Lösung in Vermischung mit Kristallpur (6.1.) und Geürzmischung (6.2.) auf 70 °C erhitzt

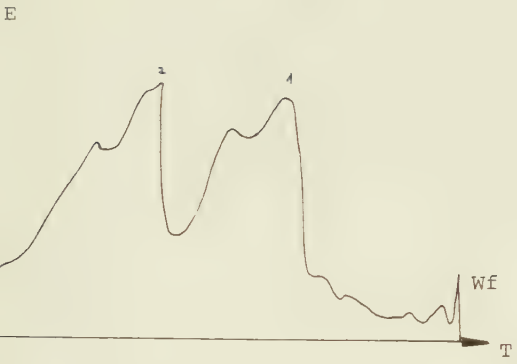


Abb. 6.1.:

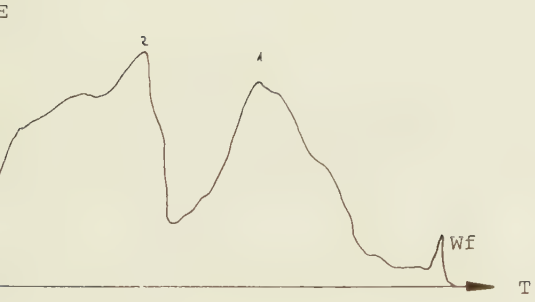


Abb. 6.2.:

Abb. 6 zeigt die Densitogramme von wäßrigen aME-Lösungen, denen Kristallpur und die bei den Modellwürsten verwendete Gewürzmischung zugesetzt worden waren. Es sollte hiermit geprüft werden, inwieweit diese Zusätze, die bei den Brühwürsten üblich sind, den Nachweis von zugesetztem Nicht-Fleischeiweiß beeinflussen. Wie die Abbildungen zeigen, ließen sich keine nachhaltigen Einflüsse hinsichtlich der auftretenden aME-Banden im elektrophoretischen Bild feststellen. Ebenso verhielt es sich mit den übrigen Fremdeiweißen, weshalb auf eine Darstellung dieser Densitogramme verzichtet wird.

Abb. 7.: Densitogramm der Modellwurst ohne Zusatz von Fremdeiweiß auf 70 °C erhitzt

Die Kontrollwurst ohne Zusatz von Fremdeiweiß zeigte im elektrophoretischen Bild ein Bandenmuster, in dem sich 4 Fraktionen mit folgenden Rf-Werten unterscheiden ließen:

1: 2,23; 2: 1,85; 3: 1,55; 4: 1,10.

Abb. 8.: Densitogramme der Modellwürste mit aME-Zusatz nach Erhitzung auf 70 °C

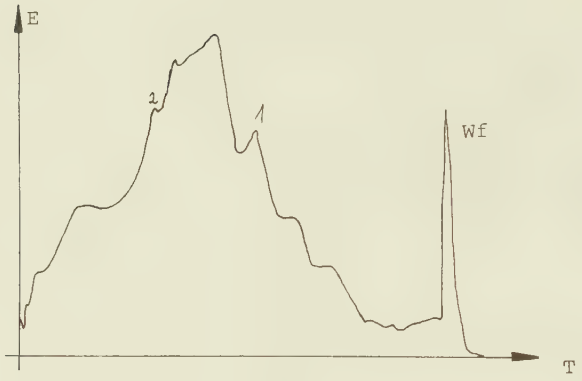


Abb. 8.1.: 0,5 % aME-Zusatz

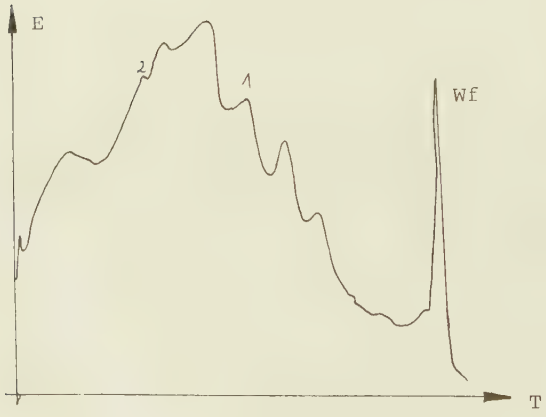


Abb. 8.2.: 1,0 % aME-Zusatz

Abb. 8.3.: 2,0 % aME-Zusatz

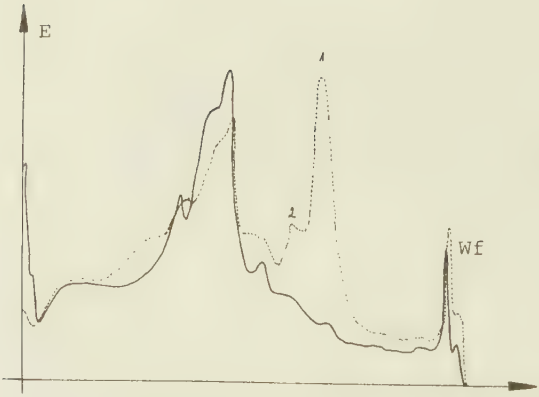
Bei den Modellwurst-Chargen mit einem Zusatz von 0,5; 1,0 und 2,0 % aME traten mehr Banden auf als bei der Kontrollwurst ohne aME. Diese ließen sich aufgrund ihrer Rf-Werte dem Bandenmuster von aME zuordnen.

Bei der Charge mit 0,5 % aME-Zusatz trat eine Bande mit einem Rf-Wert von 1,43 (2) auf, die auch im Densitogramm von reiner aME-Lösung erscheint bei den Würsten mit als auch ohne aME-Zusatz und bei reiner aME-Lösung. Es überlagerten sich hier anscheinend Banden von Fleischeiweiß und aufgeschlossenem Milcheiweiß.

Abb. 9.: Densitogramme der auf 70 °C erhitzten Modellwürste mit einem Eiklar-Zusatz (nativ)

____ Wurst ohne Eiklar
.... Wurst mit 0,5 % Eiklar

Abb. 9.1.: 0,5 % Eiklar-Zusatz



____ Wurst ohne Eiklar
.... Wurst mit 1,0 % Eiklar

Abb. 9.2.: 1,0 % Eiklar-Zusatz

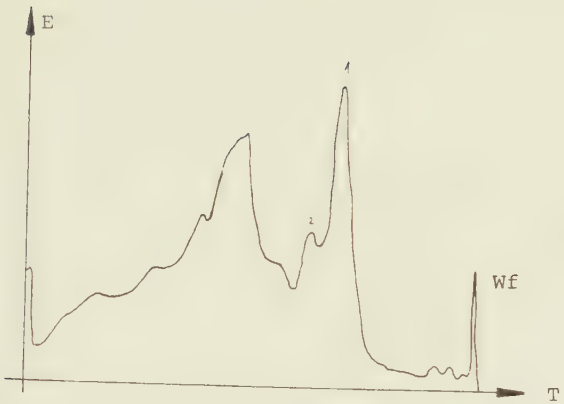


Abb. 9.3.: 2,0 % Eiklar-Zusatz

In den Densitogrammen der Modellwürste mit Zusatz von 0,5, 1,0 und 2,0 % Eiklar traten im Vergleich zur Kontrollwurst zwei zusätzliche Peaks (Rf-Werte (1) 3,32 und (2) 2,68 auf, wie Abb. 9 zeigt. Diese ließen sich dem elektrophoretischen Bild von Eiklarproteinen zuordnen.

Abb. 10.: Densitogramme der auf 70 °C erhitzten Modellwürste mit Zusatz von Sojaeiweiß

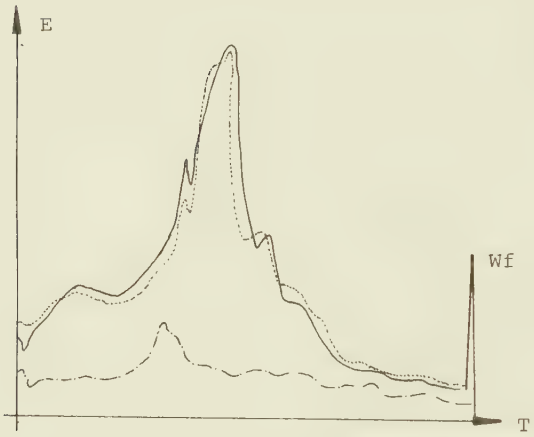
Abb. 10.1.: 0,5 % Sojaeiweiß-Zusatz

Abb. 10.2.: 1,0 % Sojaeiweiß-Zusatz

Abb. 10.3.: 2,0 % Sojaeiweiß-Zusatz

In den Densitogrammen der Modellwürste mit einem Zusatz von 0,5, 1,0 und 2,0 % Sojaeiweiß traten 2 Peaks mit den Rf-Werten von 3,81 (1) und 3,26 (2) auf, die im Bandenmuster der Kontrollwurst nicht auftauchten, jedoch in dem von reiner Sojaeiweiß-Lösung.

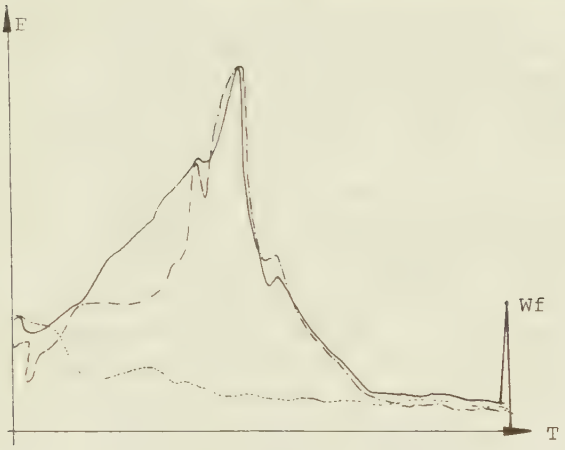
Abb. 11.: Densitogramm der Wurst mit 1 % Lactalbumin-Zusatz auf 70 °C erhitzt



.-.-.- 1 %-ige Lactalbumin-Lösung
..... Wurst mit 1 % Lactalbumin-Zusatz
_____ Wurst ohne Fremdeiweiß-Zusatz

Das Densitogramm der Wurst mit 1 % Lactalbumin-Zusatz unterschied sich von dem der Kontrollwurst nur unwesentlich. Bei reiner 1 %-iger Lactalbumin-Lösung war festzustellen, daß die beiden Peaks von Lactalbumin sich mit Fleischeiweißbanden überlagerten. Hierdurch war selbst bei 2 % Lactalbumin-Zusatz keine Zuordnung möglich.

Abb. 12.: Densitogramm von reiner 1 %-iger Weizeneiweißlösung im Vergleich mit der Modellwurst mit und ohne Zusatz von Aleuronat



..... 1 %-ige Aleuronat-Lösung
.-.-.- Wurst ohne Fremdeiweiß-Zusatz
_____ Wurst mit 2 % Aleuronat-Zusatz

Die Densitogramme von Würsten mit und ohne Weizeneiweiß-Zusatz zeigten im wesentlichen dieselben Banden. Im Vergleich mit 1 %-iger Weizeneiweißlösung, das in dieser Konzentration nur unscharfe Banden zeigte, ließen sich keine der auftretenden Banden dem Aleuronat zuordnen.

DISKUSSION

Zum Nachweis von Fremdweiweiß in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurden bislang chemische und vor allem serologische Methoden angewandt.

Milcheiweiß wurde hauptsächlich über den Phosphoranteil des Kaseins, der abgespalten und quantitativ bestimmt wird, in Fleisch-Erzeugnissen ermittelt (63, 96). Durch Bestimmung des Glucosamingehaltes wird der Zusatz von Milcheiweiß, Hühnereiweiß und Blutplasma summarisch bestimmt (58). Sojabohnenmehl wird durch Ermittlung des nicht vergärbaren Zuckers bzw. über den Nachweis von Glycenin erfaßt (3, 35). Serologische Methoden für den Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen beruhen vor allem auf der Präzipitation, Immunelektrophorese und der Indirekten Hämmagglutination (11, 12, 23, 37, 38, 39, 42, 54, 59, 77, 78, 87, 97, 98).

Der chemische Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß (THALACKER-Methode) führte bei Zusatz von Gewürzen zu Fleisch-Erzeugnissen zu "scheinbaren" bzw. "erhöhten" Na-Kaseinat-Gehalten. Die mit dieser Methode untersuchten Gewürze hatten einen "scheinbaren" Milcheiweiß-Gehalt von 0,7 % (Muskatnuß) bis 5,5 % (Majoran) (20).

Bei serologischen Untersuchungsmethoden sind als biologische Reaktionen biologische Streubreiten zu berücksichtigen, wobei die Fehlerquote je nach Methode und Ausgangsmaterial variiert. In den letzten Jahren wurde daher verstärkt nach anderen Nachweismöglichkeiten für Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen gesucht. Dazu bot sich die Elektrophorese mit verschiedenen Trägermaterialien an.

VAN BAAL und LEGET (2) wiesen aME mit der Papierelektrophorese nach. VAN GILS und HIDSKES (21) führten den Nachweis von Kasein, Sojaeiweiß und koaguliertem Eiklar auf Zellulose-Acetat-Membranfiltern durch. OLSMAN (73) wies aME mit Hilfe der Harnstoff-Stärke-Gel-Elektrophorese nach.

FREIMUTH und KRAUSE (16) identifizierten Milcheiweiß aufgrund der typischen Kaseinbanden in einem 8 %igem Polyacrylamid-Gel. SPELL (96) konnte mittels der Flach-Disk-Elektrophorese im Polyacrylamidgel aME neben Sojaeiweiß in bis auf 120 °C erhitzen Fleisch-Erzeugnissen nachweisen. FEIST (15) wies aME mit der PAGE ab einer Konzentration von 0,5 % nach.

HOFMANN und PENNY (45) identifizierten Fleisch- und Fremdeiweiß mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. HELFERAD (34) und HOMAYOUNFAR (47) sowie LEE und Mitarbeiter (66) wiesen mit der PAGE Sojaeiweiß und Na-Kaseinat in bis auf 127 °C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen aufgrund der charakteristischen Banden nach.

FROUIN und Mitarbeiter (18) erhielten mit der PAGE aus Extrakten von sterilisierten Fleisch-Erzeugnissen mit Zusatz von Sojaprotein je nach Erhitzungsgrad 2 bis 4 Banden, die sich dem Bandenmuster des Sojaeiweisses zuordnen ließen.

Andere Autoren (32, 33, 50) wiesen in ihren Arbeiten über die tierartspezifische Eiweißdifferenzierung darauf hin, daß die angegebenen Arbeitsbedingungen exakt eingehalten werden müssen. Sie verwendeten unterschiedliche Polyacrylamidgele und ließen immer Referenzproben mitlaufen.

Fokussiermethoden (50) ermöglichten neben der Tierartdifferenzierung auch eine Geschlechts- und Altersbestimmung.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde nach einem Gel gesucht, das in einem Versuchsansatz den gleichzeitigen Nachweis von mehreren Fremdeiweißen in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen ermöglicht. Hierbei erwies sich eine Polyacrylamid-Konzentration von 7,5 % mit einem kontinuierlichen pH-Wert von 8,9 als Trenngel der Wahl. Diesem wurde ein 3,5 %iges Sammelgel vorgeschaltet, um hochkonzentrierte Startzonen zu bekommen.

In den eigenen Untersuchungen wurde zur Extraktion der Fremdeiweiße aus den lypohilisierten Fleisch-Erzeugnissen physiologische Kochsalzlösung (pH 7,2) verwendet, mit der auch DEGENKOLB und HINGERLE (12), FROMM (17), KOTTER (61) und SINELL (93) Fremdeiweiß extrahierten. Der pH-Wert des homogenisierten Probengutes wurde auf pH 8,0 - 8,2 eingestellt und anschließend 2 Std. lang bei 40 °C im Brutschrank extrahiert.

Variationen der Extraktionsbedingungen wie eine Veränderung des pH-Wertes, Erhöhung der Kochsalzkonzentration, Verwendung von Elektrodenpuffer anstelle von physiologischer Kochsalzlösung, Zusatz von 70 %igem Ethanol (bei der Extraktion von Weizeneiweiß), Verlängerung der Extraktionszeit, Veränderung der Extraktionstemperatur, sowie Verwendung des Ultraschall-Homogenisators Labsonic 1510 (Fa. Braun, Melsungen) brachten keine besseren Ergebnisse. Die Densitogramme der Extrakte von lyophilisierten Fleisch-Erzeugnissen zeigten im Vergleich mit denen von nicht lyophilisierten immer wesentlich mehr Banden.

HERRMANN (42) sowie KOTTER und Mitarbeiter (59) hielten zur Extraktion der Fremdeiweiße eine vorherige Lyophilisation des Wurstgutes für unbedingt erforderlich, insbesondere bei hocherhitzten Erzeugnissen. Infolge der Lyophilisation sollen die Proteine als schwammartiges Netz- und Maschenwerk in feinster Verteilung vorliegen. Die so erreichte Vergrößerung der Oberfläche schaffe eine optimale Voraussetzung für die Lösung der Fremdeiweiße.

Die Untersuchung von 1 %igen wäßrigen Lösungen der Reinsubstanzen der Fremdeiweiße aufgeschlossenes Milcheiweiß, Sojamin^{R}, Aleuronat B (Weizeneiweiß), Lactalbumin und natives Hühnereiklar erbrachte die für die jeweiligen Eiweiße charakteristischen Banden. Die einzelnen Banden wurden mittels des Rf-Wertes definiert.

Im Bandenmuster von aufgeschlossenem Milcheiweiß konnten drei Komponenten mit verschiedenen Rf-Werten unterschieden werden. Erhitzung der Lösungen auf 40 °C, 70 °C und 120 °C veränderte das elektrophoretische Bild kaum.

MELLANDER (72) konnte bereits 1929 Kasein elektrophoretisch in die α-, ß- und χ-Fraktionen auftrennen, ebenso wie HIPP und Mitarbeiter (43).

Das elektrophoretische Bild von 1 %igen wäßrigen Lösungen von nativen Hühnereiklar zeigte in der Erhitzungsstufe von 40 °C sechs Banden, während nach Erhitzung auf 70 °C bzw. 120 °C nur mehr drei Banden vorhanden waren.

GYLSTORFF und Mitarbeiter (28) konnten natives unverdünntes Hühnereiklar in bis zu 13 verschiedene Proteinfraktionen auftrennen. Durch die in den eigenen Untersuchungen erfolgte Verdünnung des Hühnereiklars auf

eine Lösung mit einem Proteingehalt von 1 % (wobei von einem Proteinanteil im Hühnereiklar von 14 % ausgegangen wurde) erscheinen hier nur mehr die Fraktionen, die den größten Anteil an Eiweiß ausmachen.

Eine Zuordnung der einzelnen Peaks zu den verschiedenen Eiweißfraktionen des Hühnereiklars war nicht möglich, da die einzelnen Fraktionen in Reinsubstanz nicht zur Verfügung standen. Außerdem erschien eine solche Zuordnung für den qualitativen Nachweis von Eiklar in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen nicht unbedingt erforderlich.

Für Sojaeiweiß ergab sich in den drei Erhitzungsstufen von 40 °C, 70° C und 120 °C im wesentlichen dieselben Densitogramme. Es ließen sich 6 Peaks mit verschiedenen Rf-Werten identifizieren.

Bei der hocherhitzten Lösung schien eine Bande deutlicher hervorzutreten, was möglicherweise auf eine Denaturierung von Begleitproteinen zurückzuführen ist. Dies scheint den qualitativen Nachweis von Sojaeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen jedoch nicht zu stören.

Im Gegensatz zu FEIST (15) konnten auch nach Erhitzung auf 120° C noch die Banden von Sojaprotein nachgewiesen werden, wie sie auch SPELL (95) mit der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese erhielt.

Lactalbumin zeigte im elektrophoretischen Bild zwei Banden, die bei allen Erhitzungsstufen auftraten.

Die Banden von Aleuronat B waren in 1 %iger wäßriger Lösung nur schwach ausgebildet. Erst eine Erhöhung der Konzentration auf 4 % ließ mehrere Banden deutlich werden. JONES und Mitarbeiter (49) trennten mit der

Elektrophorese Weizeneiweiß in fünf Gliadin- und in eine Gluteninkomponente. Mittels der Stärke-Gel-Elektrophorese konnten sie acht Gliadinfraktionen unterscheiden. Da jedoch in den eigenen Untersuchungen von maximal 2 % Weizeneiweißzusatz ausgegangen wurde, konnte auf eine weitere Untersuchung und Lokalisierung der einzelnen Fraktionen verzichtet werden, da selbst in reiner Lösung erst ab einer Konzentration von 4 % Aleuronat B deutlichere Banden zu unterscheiden waren. Ein Nachweis in den Extrakten war daher nicht möglich.

Um zu kontrollieren, inwieweit Kristallpur und die von uns verwendete Gewürzmischung den elektrophoretischen Nachweis des zugesetzten Fremdeiweißes stören, wurden diese mit den reinen Fremdeiweißlösungen vermischt. Wie die Densitogramme der aME-Lösungen in Kombination mit Kristallpur bzw. der o.a. Gewürzmischung zeigten, war kein störender Einfluß auf das elektrophoretische Bild von aME festzustellen. Die Untersuchung der übrigen Fremdeiweiße führte zu gleichen Resultaten. Aus diesem Grunde konnte auf eine Darstellung dieser Eiweiße in Densitogrammen verzichtet werden.

Die von FEIST (15) untersuchten Kutterhilfsmittel hatten keinen Einfluß auf den qualitativen Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen.

Die Untersuchung der Kontrollwurst ohne Zusatz von Fremdeiweiß ergab ein elektrophoretisches Bild, das 4 Banden mit folgenden Rf-Werten unterscheiden ließ:

Bande:	Rf
1.	2,23
2.	1,85
3.	1,55
4.	1,10

Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in den auf 70 °C erhitzten Modellwürsten konnte mit Hilfe der Bande mit dem Rf-Wert 1,43 ab einer Konzentration von 0,5 % geführt werden. Diese Bande erschien nicht in der Kontrollwurst, jedoch bei der Wurst mit aME-Zusatz und reiner aME-Lösung. Die Bande mit dem Rf-Wert 2,23 trat sowohl bei der Wurst mit als auch ohne aME-Zusatz und bei reiner aME-Lösung auf. Es kam hier zu einer Überlagerung von Fleisch- und Milcheiweißbanden.

Im Gegensatz zu FEIST (15) traten die für aME spezifischen α - und ß-Banden nicht sehr deutlich hervor. Dies ist auf die Verwendung eines Gels für den spezifischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß bei FEIST (15) zurückzuführen.

Auch andere Autoren wie FREIMUTH und KRAUSE (16) identifizieren aME in Extrakten aus Fleisch-Erzeugnissen aufgrund der typischen Bandenlokalisation von α- und ß-Kasein.

In den hier durchgeführten Untersuchungen traten die Fleischeiweißbanden jedoch so stark in Erscheinung, daß sie sich teilweise mit den aME-Banden überlagerten bzw. nahe beieinander lagen. Die Banden wurden deshalb mittels des Rf-Wertes lokalisiert.

Hühnereiklar ließ sich ab einer Konzentration von 0,5 % in den Modellwurst-Chargen, die auf 70 °C erhitzt worden waren, durch das Auftreten von zwei charakteristischen Banden (Rf-Werte: 3,32 und 2,68), die sich eindeutig dem Bandenmuster von Hühnereiklar zuordnen ließen, nachweisen. Die Banden waren so deutlich von den charakteristischen Proteinmuster der Kontrollwurst abgesetzt, daß vermutet werden kann, mit der hier beschriebenen Methode lassen sich ein noch geringerer Hühnereiklar-Zusatz nachweisen.

VAN GILS und HIDSKES (21) gaben in ihren Untersuchungen mittels Elektrophorese auf Zellulose-Acetat-Membranfiltern über den Zusatz von koaguliertem Hühnereiklar in Fleisch-Erzeugnissen eine untere Nachweisgrenze von 0,5 % an.

Der Nachweis von Sojaeiweiß in den auf 70 °C erhitzten Modellwürsten konnte ab einer Konzentration von 0,5 % durch das Auftreten zweier Peaks mit den Rf-Werten von 3,81 und 3,26 geführt werden, die nicht im Densitogramm der Kontrollwurst erschienen, jedoch im Bandenmuster von reiner Sojaeiweißlösung auftraten.

Eine untere Nachweisgrenze von 0,1 % für Sojaeiweiß, wie sie HIDSKES und VAN GILS (21) mittels der Elektrophorese angeben, war mit der hier angegebenen Methode nicht möglich.

Die Banden von Lactalbumin wurden von Banden der Fleischeiweisse so überlagert, daß eine Unterscheidung nicht mehr möglich war.

Das Densitogramm der Wurst mit Weizeneiweißzusatz war mit dem der Kontrollwurst nahezu identisch. Eine Identifizierung war deshalb nicht möglich.

Der Nachweis der untersuchten Fremdeiweiße in auf 120 °C erhitzten Modellwürsten war mit der beschriebenen Methode nicht möglich. Es ergaben sich im elektrophoretischen Bild nur durchgehend gefärbte Laufspuren, die in den Densitogrammen zu keinen Peaks führten.

Die von FEIST (15) beschriebene Beobachtung, nach der sich das aus hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen extrahierte aME deutlicher darstellen läßt, als das aus bis 70 °C erhitzte, was mit der völligen Hitzedenaturierung des Fleischeiweißes erklärt wird, konnte durch eigene Untersuchungen nicht bestätigt werden.

SPELL (95), HELFERAD (34) und HOMAYOUNFAR (47) konnten aME bzw. Sojaeiweiß in Erzeugnissen, die z.T. bis auf 127 °C erhitzt worden waren, im Gegensatz zu eigenen Erkenntnissen, elektrophoretisch nachweisen.

Nachdem bereits gleich hohe Konzentrationen der untersuchten Fremdeiweißlösungen und Extrakte in ihren Densitogrammen auch bei Wiederholung ein und derselben Laufspuren unterschiedliche Bandenhöhen aufwiesen, war mit der dieser Arbeit zugrundeliegenden Methode eine quantitative Bestimmung von Fremdeiweiß nicht möglich.

Aufgeschlossenes Milcheiweiß mit einem Rohproteingehalt von 87 %, Hühnereiklareiweiß (auf einen Rohproteingehalt von 100 % umgerechnet) und Sojaeiweiß mit einem Rohproteingehalt von 85 % konnten ab einem Zusatz von 0,5 % in den bis auf 70° C erhitzten Modellwürsten mit der beschriebenen Methode eindeutig nachgewiesen werden. Bei Hühnereiklar scheint sogar ein noch niedrigerer Zusatz erfaßbar zu sein. Inwieweit ein Nachweis von diesen zugesetzten Fremdeiweißen in Fleisch-Erzeugnissen, die auf Temperaturen zwischen 70 und 120° C erhitzt werden, möglich ist, wurde bei diesen Untersuchungen nicht abgeklärt.

Ein entscheidender Vorteil dieser Methode besteht in der relativ einfachen Durchführbarkeit und dem möglichen großen Probendurchsatz. Das verwendete Gerät hat eine Kapazität von 96 Proben je Versuchsansatz.

Nach den vorliegenden Ergebnissen eignet sich diese Methode als qualitativer Nachweis für den spezifischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß, Hühnereiklar und Sojaeiweiß in bis auf 70° C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen vom Typ Brühwurst.

ZUSAMMENFASSUNG

Die lebensmittelrechtlichen Vorschriften zur Verarbeitung von Fremdeiweißen in Fleisch-Erzeugnissen und die Literatur über die technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen sowie die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Fremdeiweiße werden kurz besprochen. Außerdem wird auf die serologischen und nicht serologischen Nachweismethoden, die verschiedenen Extraktionsverfahren der Fremdeiweiße aus Fleisch-Erzeugnissen und auf elektrophoretische Verfahren, insbesondere auf die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, eingegangen.

In eigenen Versuchen wurden Gelsysteme mit Trenngelen verschiedener Acrylamid-Konzentrationen getestet. Dabei wurde ein Trenngel mit einer Acrylamid-Konzentration von 7,5 % und einem kontinuierlichen pH-Wert von 8,9 als vorteilhaft erkannt.

Mit diesem Gel wurden einprozentige wäßrige Lösungen von aufgeschlossenem Milcheiweiß, Lactalbumin, Sojaeiweiß und Eiklareiweiß (die auf 40° C, 70° C und 120° C erhitzt worden waren) untersucht. Die Densitogramme der untersuchten Fremdeiweiße unterschieden sich bei den verschiedenen Temperaturen kaum. Bei Weizeneiweiß waren klare Banden erst ab Konzentrationen von 4 % zu erhalten.

Kristallpur und die verwendete Gewürzmischung hatten keinen Einfluß auf das elektrophoretische Bandenmuster der untersuchten Eiweiße.

Auf 70° C und 120° C erhitzte Modellbrühwürste wurden mit einem Zusatz von 0,5 %, 1,0 % und 2,0 % aufgeschlossenen Milcheiweiß, Lactalbumin, Sojaeiweiß, Eiklareiweiß und Weizeneiweiß mit dieser Methode untersucht.

Aufgeschlossenes Milcheiweiß (mit einem Rohproteingehalt von 87 %), Eiklareiweiß (auf einen Rohproteingehalt von 100 % umgerechnet) und Sojaeiweiß (mit einem Rohproteingehalt von 85 %) waren in den auf 70° C erhitzten Modellwürsten ab einem Zusatz von 0,5 % eindeutig, Lactalbumin (mit einem Rohproteingehalt von 75 %) und Weizeneiweiß (mit einem Rohproteingehalt von 82,4 %) nicht nachzuweisen.

In den auf 120° C erhitzten Modellwurstchargen konnten die untersuchten Fremdeiweiße nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese erscheint nach diesen Untersuchungen gut geeignet für den qualitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß, Eiklareiweiß und Sojaeiweiß in bis auf 70° C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen vom Typ Brühwurst, wobei die Nachweisgrenze bei 0,5 % liegt. Die Methode ist relativ leicht durchführbar und ermöglicht einen großen Probendurchsatz. Sie eignet sich dadurch u.a. besonders als "qualitativer Nachweis" für Reihenuntersuchungen.

SUMMARY

The subject matter is the food product laws in connection with the usage of foreign proteins in meat products and the literature concerning the technological meaning foreign proteins in the production of meat products as well as the chemical-physical meaning of the foreign proteins. In connection therewith it is refered to the serologic and non-serologic proof methods, the different extraction procedures of the foreign proteins from the meat products and the electrophoretic procedures, v.a. the polyacrylamid-gel-electrophorese.

In own tests we investigated gel systems with separationgels of various acrylamid-concentrations. During those tests a separation-gel with an acrylamid-concentration of 7,5 % and a constant pH-value of 8,9 was considered as favourable.

With this gel onepercent fluid solutions of disintegrated milk protein, lactalbumin, soya protein and egg white albumin were examined which had been heated up to 40° C, 70° C and 120° C. The densitograms of the examined foreign proteins varied hardly under the different temperatures. With the wheat protein clear spreads could only be obtained with concentrations starting from 4 %.

Crystal trace and the used seasons mixture had no influence on the electrophoretic spread pattern of the examined proteins.

Model-charges heated up to 70° C and 120° C were examined with an addition of 0,5 %, 1,0 % and 2,0 % of disintegrated milk protein, lactalbumin, soya protein, egg white albumin and wheat protein according to this method.

Disintegrated milk protein (with a raw protein content of 87 %), egg white albumin (calculated on an contents of 100 %) and soya protein (with a raw protein content of 85 %) could clearly, lactalbumin (with a raw protein content of 75 %) and wheat protein (with a raw protein content of 82,4 %) could not be proved in the model-charges heated up to 70° C beginning with an addition of 0,5 %.

In the model sausage charges heated up to 120° C the examined foreign proteins could no longer be proved.

According to these examinations the polyacrylamid-gel-electrophorese appears well suited for the qualitative proof of disintegrated milk protein, egg white albumin and soya protein in meat products of the type "Brühwurst" heated up to 70° C, whereby the proof limit is by 0,5 %. It is relatively simple to carry out and allows a big sample-number. Therefore it is especially suited for "qualitative proofs" for mass examinations.

LITERATURVERZEICHNIS

1. APPELQUIST, L.A., und B. PERSSON:
Nachweis von Milcheiweiß, Eiereiweiß und Sojaprotein in Handelsprodukten aus zerkleinertem Fleisch.
Food Sci. Technol. Abstr. 11 (1979), 328

2. BAAL, J.P.W. van, und J.N. LEGET:
Nachweis von Kasein und Na-Kaseinat in Fleischprodukten.
Z. Lebensm.Unters.Forsch. 127 (1965), 263

3. BAILEY, J.: zitiert von BOCKSCH W.: Isoliertes Sojaeiweiß, ein möglicher Hilfsstoff für lang zu lagernde Brühwurstkonserven.
Fleischwirtschaft 45 (1965), 779

4. BELITZ, H.-D., und J. SCHORMÜLLER:
Aminosäuren, Peptide, Proteine und andere Stickstoffverbindungen.
In: SCHORMÜLLER, J.: Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd I
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1965, S. 167

5. BLIX, G., K. FELIX, W. GRASSMANN, J. TRUPKE, D. ACKERMANN und F. SCHNEIDER:
Eiweißstoffe und ihre Abbaustufen.
In: FLASCHENTRÄGER, B. u. E. LENARTZ:
Physiologische Chemie, Bd I
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1951, S. 484

6. BOWERS, J.A., und P.P. ENGLER:
Zerkleinertes Rindfleisch mit texturiertem Sojaeiweiß.
Fleischwirtschaft 55 (1975), 14, 71

7. BRENDL, J., und S. KLEIN:
Der Einfluß von Milcheiweißzusätzen auf das Wasserbindungsvermögen des Fleisches.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 339

8. COHEN, E.H.:Protein changes related to ham processing temperatures.
I. Effect of time-temperature on amount and composition of soluble proteins.
J. Food Sci. 31 (1966), 746

9. COONS, A.H., and M.H. KAPLAN:
Localisation of antigen in tissue cells.
II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J. Exper. Med. 91 (1950), 1

10. DAVIS, B.J.: Disc-Electrophoresis.
II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad.Sci 121 (1964), 404

11. DEGENKOLB, E., und M. HINGERLE:
Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 241

12. DEGENKOLB, E., und M. HINGERLE:
Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleisch-Erzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 73

13. DITTMER, A.: Plasmaeiweiß und Elektrophorese.
3. Aufl., VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965, S. 5, 22

14. DRAKE, J.R., R.D. KLUTER und C.L. HINNERGARDT:
Texturiertes Sojaprotein erhöht die Qualität gefriergetrockneter Rinderhacksteaks.
Fleischwirtschaft 581 (1978), 881

15. FEIST, H.: Spezifischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Diss. med. Vet., München 1975

16. FREIMUTH, U. und W. KRAUSE:
Zum gelektrophoretischen Nachweis von Fremdproteinen in Milch und Fleisch-Erzeugnissen.
Mitt. Bl. DGCH Fachgruppe-Lebensmittelchemie und gerichtl. Chemie 22 (1968), 217

17. FROMM, G.: Zum immunologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen.
Arch. Hyg. 151 (1964), 702

18. FROUIN, A., C. BARRAUD und D. JONDEAU:
Bestimmung von 0,1 % Caseinat oder Sojaprotein in sterilisierten Fleisch-Erzeugnissen mittels einer elektrophoretischen Methode unter Verwendung von Harnstoff und Mercaptoäthanol.
Food.Sci. Technol. Abstr. 6 (1974), 425

19. GERIGK, K., und H. KRÜGER:
Untersuchungen zur Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleischwaren.
Zbl. Vet. Med. B 19 (1972), 226

20. GERHARD, U. und R. KAUPER:
Vergleichende Untersuchungen über den "scheinbaren" Milcheiweißgehalt in Gewürzen nach der THALACKER-Methode.
Fleischwirtschaft 59 (1979), 97

21. GILS, W.F. van, und G.G. HIDSKES:
Nachweis von Casein, Sojaeiweiß und koaguliertem Eiklar in Fleisch-Erzeugnissen mit der Elektrophorese auf Zelluloseacetat-Membranfiltern.
Lebensm.Unters.Forsch. 151 (1973), 175

22. GLICK, B.: Serumprotein electrophoresis patterns in acrylamidgel: patterns from normal and bursaless birds.
Poultry Sci. 47 (1968), 807

23. GRABAR, P., et C.A. WILLIAMS:
Methode permettant l'etude conjugée des propriétés electrophorétiques et immunochimiques d'un mélanges de proteines. Application au sérum sanguin.
Biochim.Biophys. Acta 10 (1953), 193

24. GRAHAM-SMITH, G.S.:
The biological or precipitin test for blood, considered mainly from its medico-legal aspect.
J. Hyg. 3 (1903), 354

25. GROSS, D.: Electrophoresis in stabilizing media.
Analyst 90 (1965), 380

26. GÜHNE, W., und A. SCHMID:
Untersuchungen über die Verwendung von Hühnereiweiß bei der Herstellung von Wurstkonserven.
Fleischwirtschaft 55 (1975), 90

27. GÜNTHER, H.:
Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 97

28. GYLSTORFF, I., H.P. SCHELLNER und C.H. SCHETTLER:
Elektrophoretische Untersuchungen von Eiklarproteinen im Polyacrylamid-Gel.
Zbl. Vet. Med. B 17 (1970), 830

29. HARBORNE, J.B., and VAN SUMERE C.F.:
The Chemistry and Biochemistry of
Plant Proteins.
Acad. Press, London, N.Y., San Francisco, 1975

30. HAUROWITZ, F.:
Dilatometrische Untersuchungen der Hitzedenaturierung von Eiweißlösungen.
Kolloid.Z. 71 (1935), 198

31. HAUROWITZ, F.:
Eiweißdenaturierung,
In: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd IV/1,
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg
1960, S. 116

32. HEINERT, H.H., und A. KLINGER:
Tierartspezifische Eiweißdifferenzierung.
Polyacrylamidgel-Elektrophorese zum
Nachweis der Tierart.
Fleischwirtschaft 58 (1978), 1490

33. HEINERT, H.H., und A. KLINGER:
Protein- und Enzymmuster bei Reh (Capreolus Capreolus) und Hirsch (Cervus elaphus).
Fleischwirtschaft 60 (1980), 1682

34. HELFERAD, B.:
Bestimmung von zugesetztem Sojaprotein
und Na-Caseinat in sterilisierten Fleisch-Erzeugnissen mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Tidsskrift for Hermetikindustri 59 (1973), 224

35. HENDREY, W.B.:
Industr. Engng.Chem.Analyt.Edit. 11 (1939), 611
In: Archiv Lebensmittelhygiene 19 (1968), 274

36. HENNING, H.J.:
Löslichkeit.
In: SCHORMÜLLER, J.: Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. II/1,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965, S. 179

37. HERRMANN, Ch.:
Über den Nachweis von hitzedenaturiertem Hühnereiklar in Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämmagglutination.
Diss. Vet. med., München 1963

38. HERRMANN, Ch.:
Über die zugleich quantitative Differenzierung von erhitztem Eiweiß mittels der indirekten Hämmagglutination.
Berl.Münch. Tierärztl. Wschr. 78 (1965), 370

39. HERRMANN, Ch., D. HOLPERT und G. PFEIFFER:
Zur serologischen Erfassung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 17 (1966), 12

40. HERRMANN, Ch., und L. KOTTER:
Serologische Verfahren bei der Überwachung von Fleisch-Erzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 265

41. HERRMANN, Ch.:
Serologische Untersuchungsmethoden in der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung.
Wehrmed. 7 (1969), 16

42. HERRMANN, Ch., Ch. MERKLE und L. KOTTER:
Zur Problematik serologischer Nachweisreaktionen für Fremdeiweiß in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen.
1. Mitt.: Präzipitationsreaktionen.
2. Mitt.: Aggulitationsreaktionen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 97, 249

43. HIPP, N.J., M.L. GROVES, J.H. CUSTER and T.L. MCMEEKIN:
Separation of K-Casein.
J.Am.Chem.Soc. 72 (1950), 4928

44. HJERTÉN, S., S. JERSTEDT and TISELIUS:
Electrophoretic "particle sieving" in polyacrylamidgels as applied to ribosomes.
Anal.Biochem. 11 (1965), 211

45. HOFMANN, K., und J.F. PENNY:
Eine Methode zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiß mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Flachgelen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 252

46. HOLPERT, D.:
Zum histochemischen und immunhistochemischen Nachweis von Milcheiweiß in Brühwürsten.
Diss. med. vet., München 1965

47. HOMAYOUNFAR, H.:
Bestimmung von Sojaproteinen in Erzeugnissen auf Fleischgrundlage mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Fleischwirtschaft 57 (1977), 225

48. JENNESS, R., und S. PATTON:
Grundzüge der Milchchemie.
Bayer. Landwirtschaftsverlag, München-Basel-Wien 1967

49. JONES, R., W. TAYLOR N.W., und F.R. SENTI:
Electrophoresis and fractionation of wheat gluten.
Arch. Biochem.Biophys. 84 (1959), 363
In: HLYNKA, J.: Wheat Chemistry and Technology
American Association of Cereal Chemists, Inc.
St. Paul, Minnesota 1964, 232

50. KAISER, K.-P., G. MATHEIS, Chr. KUNTA-DÜRRMANN und H.-D. BELITZ:
Identifizierung der Tierart bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten durch Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden.
Z. Lebensm.Unters.Forsch. 170 (1980), 334

51. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 5. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966

52. KIRCHMEIER, O.:
Milchserumproteine
In: SCHORMÜLLER, J.: Handbuch der
Lebensmittelchemie, Bd. III/1,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1968, S. 41

53. KLUGE, H.: Über den Nachweis von aufgeschlossenem
Milcheiweiß und Magermilchpulver in Fleisch
und Wurst.
Lebensm.Unters.Forsch. 80 (1940), 209

54. KLUGE-WILM, R.:
Serologischer Nachweis von Milcheiweiß
in hocherhitzten Fleischwaren.
Diss.med.vet., Berlin 1967

55. KOHLRAUSCH, F.:
Über Konzentrationsverschiebungen durch
Elektrolyse im Inneren von Lösungen mit
Lösungsgemischen.
Ann.Phys. Chem. 62 (1897), 209

56. KOLB, M.: Zur Untersuchung des Protein- und
Enzymmusters der Haut.
Das Protein- und Naphtylacetat (Esterase)-
Muster der Kopf-, Bauch- und Schienbeinhaut.
Diss.med., Heidelberg 1971

57. KOTTER, L., und O. PRÄNDL:
Chemisch-physikalische Vorgänge bei der
Brühwurstfabrikation.
Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1956), 219

58. KOTTER, L., und B. ROLLE:
Aminosäuren und Aminozucker als Kriterien bei der Beurteilung von Fleischwaren.
Wiener Tierärztl. Mschr. 48 (1961), 372

59. KOTTER, L., Ch. HERRMANN und G. CORSICO:
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren mittels der indirekten Hämagglutination.
Z. Lebensm.Unters.Forsch. 133 (1966), 15

60. KOTTER, L., A. PALITZSCH und Ch. HERRMANN:
Technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der Fleischwarenverarbeitung.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 261

61. KOTTER, L., und Ch. HERRMANN:
Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion für Fremdeiweiße.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 267

62. KOTULA, A.W., G.G. TWIGG and E.P. YOUNG:
Evaluation of beef patties containing soy protein, during 12-month frozen storage.
J.Food Sci 41 (1976), 1142

63. KUTSCHER, W., W. NAGEL und W. PFAFF:
Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen.
Z. Lebensm.Unters.Forsch. 115 (1961), 117

64. LANDSTEINER, K.:
Über die Bedeutung der Proteinkomponente
bei den Präzipitinreaktionen der Azoproteine.
XIII. Mitt. über Antigene
Biochem. Z. 93 (1919), 106

65. LARSON, B.L., and R. JENNESS:
ß-Lactoglobulin.
Biochem. Preparations 4 (1955), 23
In: JENNESS R., S. PATTON: Grundzüge der Milchchemie
Bayer. Landwirtschaftsverlag München-Basel-Wien
1967

66. LEE, Y.B., D.A. RICKANSRUDD, E.C. HAGBERG, E.J. BRISKEY and M.C. GREASER:
Quantitative determination of soybean
protein in fresh and cooked meat-soy blends.
J.Food.Sci. 40 (1975), 380

67. LOEFFLER, F.:
Über ein neues Verfahren zur Gewinnung
von Antikörpern.
Dt. Med. Wschr. 30 (1904), 1913

68. LOTZ, R., Ch. HERRMANN und P. WEIGERT:
Milcheiweißnachweis in Fleisch-Erzeugnissen
mittels der Disk-Elektrophorese.
(Vorläufige Mitteilung).
Arch. Lebensmittelhyg. 24 (1973), 47

69. MAURER, H.R.:
Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid-gel-electrohporesis.
2. Aufl., Walter de Gruyter Verlag,
Berlin-New York 1971

70. MÄKINEN, J., I. de WREEDE, H. STEGEMANN und H.H. HEINERT:
Löslichkeit und gel-elektrohoretische Muster hitzedenaturierter Proteine, auch von stärkehaltigen Proben, nach Einwirkung von Na-dodecylsulfat (SDS).
Z. Lebensm.Unters.Forsch. 168 (1979), 282

71. MEISSL, E., F. BÖCKER:
In: KLARE S. MARKLEY, WARREN H. GOSS:
Soybean Chemistry and Technology
Chemical Publishing Company, Inc.
Brocklyn, N.Y. (USA), 1944, 15

72. MELLANDER, O.:
Electrophoretic investigations of casein.
Biochem. Z. 300 (1939), 240

73. OLSMAN, W.J., W.C.H. HOUTEPEN und C. van LEEUWEN:
Elektrophoretischer Nachweis von fleisch-fremden Eiweißen in Fleisch-Erzeugnissen.
Z. Lebensm.Unters.Forsch. 141 (1969), 253

74. ORNSTEIN, L.:
Ann. N.Y. Acad.Sci. 121 (1964), 321
Zitiert nach MAURER, H.R. (70)

75. OSBORNE, Th.B., and G.F. CAMPBELL:
J.Am.Chem.Soc. 20 (1898), 419
Zitiert nach MAURER H.R. (70)

76. OSBORNE, Th.B., and S.H. CLAPP:
Am.J.Phys. 19 (1907), 468
Zitiert nach MAURER H.R. (70)

77. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion in gel-methods for immunological analysis. I.
Progr. Allergy 5 (1958), 1

78. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffussion in gel-methods for immunological analysis. II.
Progr. Allergy 6 (1962), 30

79. PRÄNDL, O., K. KNIEWALLNER und J. HAAS:
Technologische und hygienische Fragen zur Verwendung von Eiprodukten bei der Brühwurstherstellung.
Fleischwirtschaft 44 (1964), 1223

80. PUTNAM, F.W.:
Protein denaturation.
In: NEURATH-BAILEY: Proteins Bd. I B
Academic Press, New York-London, 1963, S. 809

81. RAYMOND, S., and L. WEINTRAUB:
Acrylamidgel as supporting medium for zone electrophoresis.
Science 130 (1959), 711

82. ROULET, D.L.A., M. BEIN und G. von MURALT:
Immunelektrophoretische Untersuchungen
an Kuhmilchpräparaten.
Milchwiss. 16 (1961), 415

83. SCHORMÜLLER, J.:
Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. III/2
Springer Verlag, Heidelberg-Berlin-New York
1968, S. 886

84. SCHORMÜLLER, J.:
Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. V/1
Springer Verlag, Heidelberg-Berlin-New York
22 (1967), 395

85. SCHEIBNER, G.:
Serologische Eiweißdifferenzierung mittels
Präzipitation im Agar-Gel.
Mh.Vet.Med. 15 (1960), 341

86. SCHEUNERT, A., und A. TRAUTMANN:
Lehrbuch der Veterinärphysiologie.
Parey-Verlag, Berlin 1976

87. SCHMIDT, H.:
Fortschritte der Serologie, 2. Auflage.
Verlag Steinkopff, Darmstadt 1955, 744

88. SCHULTE, K.E., und F. MÜLLER:
Elektrophoretische Studien an Milchproteinen.
Milchwiss. 10 (1955), 90

89. SHELEF, L.B., und I.R. MORTON:
Soybean protein foods.
Food Technology 30 (1976), H. 4, S. 44

90. SINELL, H.-J.:
Walfleischuntersuchung.
Fleischwirtschaft 11 (1959), 191

91. SINELL, H.-J.:
Über die Differenzierung von Walfleisch in Lebensmitteln.
Ref. in Berlin-München, Tierärztl.Wschr. 72 (1959), 213

92. SINELL, H.-J.:
Versuche zum biologischen Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine.
Zbl.Vet.Med. B 8 (1961), 57, 101

93. SINELL, H.-J., und R. KLUGE-Wilm:
Immunelektrophoretischer Nachweis von aME in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen und Versuche zu einer quantitativen Auswertung.
Zbl. Vet.Med. B 15 (1968), 802

94. SMITHIES, O.:
Zone electrophoresis in starch gels and its applications to studies of serum proteins.
Advances in Protein Chem. 14 (1959), 65

95. SPELL, E.: Nachweis von Milcheiweiß und Sojaeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen mit Hilfe der vertikalen Flachdisk-Elektrophorese.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 1451

96. STADELMANN, W.:
Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen.
Z.Lebensm.Unters.Forsch. 117 (1962), 24

97. STAVITSKY, A.B.:
Micromethods for the study of proteins and antibodies.
J. Immunol. 72 (1954), 360, 368

98. STAVITSKY, A.B., and E.R. ARQUILLA:
Micromethods for the study of proteins and antibodies.
J. Immunol. 74 (1955), 306

99. TONGUR, W.S.:
Einige Fragen zur Umkehrbarkeit der Eiweißdenaturierung.
In: Zur Biochemie des Eiweißes
Sammlung sowjetischer Arbeiten
VEB Dt. Verlag der Wissenschaften, Berlin
1956, S. 38

100. UHLENHUTH, P., und W. SEIFFERT:
Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. III
Fischer Verlag, Jena 1950

101. Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen.
(Lebensmittel und Bedarfsgegenständegesetz)
vom 15. August 1974
i.d.F. von 24.8.1976 (BGBl. I. S. 2445, 2481)
Verlag C.H. Beck, München

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c. L. Kotter für die Überlassung des Themas.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn OFVet. Dr. P. Maurus für die eingeräumten Arbeitsmöglichkeiten an der Veterinäruntersuchungsstelle der Bundeswehr VI.

Herzlich danke ich auch Herrn OStVet. Dr. P. Weigert für die Betreuung und hilfreiche Beratung bei der Anfertigung der Arbeit, sowie den Herren Dr. Ch. Ring und Dr. H. Schmidt für ihre Vorschläge bei der schriftlichen Abfassung und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

LEBENSLAUF

Geburtsdatum:	5. November 1952
Geburtsort:	Irching/Inn
Vater:	Josef Hellmannsberger, Rentner
Mutter:	Maria Hellmannsberger, geb. Strasser, Hausfrau
1959-1963:	Volksschule Aigen/Inn
1963-1972:	Humanistisches Kurfürst-Maximilian-Gymnasium in Burghausen
1972-1973:	Grundwehrdienst beim 5. San/Btl 4 in Regensburg
1973-1978:	Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1977:	Beginn der Dissertation an der Veterinäruntersuchungsstelle der Bundeswehr VI
9.11.1978:	Staatsexamen Tiermedizin
12.12.1978:	Approbation als Tierarzt
August 1979- April 1980:	Assistent bei Herrn Dr. H. Horn in Gars/Inn
Mai-Juli 1980:	Assistent bei Herrn Dr. U. Hölzle in Tann
1. Sept. 1980:	Vorbereitungsdienst für den amtstierärztlichen Dienst